

Cândice Maria Boff

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA
COMUNIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL ASSOCIADA À
ESPONJA MARINHA *Hymeniacidon perleve***

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como parte das
exigências para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Admir José
Giachini

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boff, Cândice Maria
Isolamento e identificação molecular da comunidade
bacteriana cultivável associada à esponja marinha
Hymeniacidon perlewe / Cândice Maria Boff ; orientador,
Admir José Giachini - Florianópolis, SC, 2015.
67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Porifera. 3. Microbiota. 4.
Taxonomia Bacteriana. 5. Fragmento 16S de RNA Ribossômico.
I. Giachini, Admir José. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Cândice Maria Boff

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA
COMUNIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL ASSOCIADA À
ESPONJA MARINHA *Hymeniacidon perleve***

Este Trabalho de Conclusão do curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 13 de julho de 2015.

Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Admir José Giachini
Orientador

Dr. João Luís Carraro
Membro Titular

Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Membro Titular

Dr. Rafael Dutra de Armas
Membro Suplente

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que, em maior ou menor grau, contribuíram para o desenvolvimento da minha paixão pela Microbiologia – em especial àqueles que me ajudaram a resgatá-la quando ela pareceu perdida.

AGRADECIMENTOS

Relacionamentos não dão certo e terminam. Às vezes, você se joga de corpo e alma em uma paixão e acaba tão envolvido que não consegue enxergar que não está funcionando. Mas a verdade sempre vem à tona e você fica arrasado quando descobre. Aquilo não é pra você, e você tem que aprender a lidar com isso. Se um dia for pra acontecer, vai acontecer, e não há nada que você possa fazer pra evitar. Assim foi o meu relacionamento com a Microbiologia. Achei que tinha perdido um “grande amor”, mas o destino o trouxe de volta da forma mais inesperada possível. Não foi com muito bom humor que eu recebi a notícia de que teria que repetir a disciplina durante o meu ano de intercâmbio, mas uma única aula foi o bastante pra me fazer lembrar de que aquilo era o que eu queria pra minha vida. Por ser a responsável por esse resgate, que eu imaginava impossível, agradeço em primeiro lugar (desculpa, mãe!) a Joy Watts: pelas aulas fantásticas, pelo bom humor sempre um tanto ácido, pelos puxões de orelha, e por ter aceitado me orientar no meu estágio final no laboratório de Microbiologia da Universidade de Portsmouth. Não tenho palavras pra explicar o quanto essa oportunidade me foi importante. Sem ela, este trabalho não existiria, e talvez eu ainda não tivesse ideia alguma sobre o meu futuro.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, por sempre ter batalhado com todo o seu esforço pra me dar a educação que ela não pôde ter, e por me incentivar a sempre colocar os estudos em primeiro lugar. Pela espetacular criação que ela me proporcionou, por ser sempre um ombro amigo, por tolerar minhas crises e me apoiar em (quase) tudo.

Aos meus mais queridos Irrelevantes, companheiros pra todas as horas, todos os papos, todos os programas, toda a vida! Por estarem sempre ao meu lado ao longo de toda a graduação, aprendendo juntos, almoçando, jantando, tomando café da manhã juntos, dormindo juntos, viajando juntos, estudando juntos, bebendo juntos, aprendendo juntos, crescendo juntos. Amo vocês de todo o meu coração!

À minha segunda família, o 4º andar do Harry Law, que viveram ao meu lado o ano maravilhoso que passei em Portsmouth. Pelos perrengues, pelas conversas de corredor, pelos hamburgões bolados, pelos litros de Carlsberg, pelos passeios de bike, pelos piqueniques em Southsea, pelas idas ao Tesco, pelas Tiger Tigers e Astorias e King's, pelos Meal Deals e Everyday Values e pelos laços que criamos ao longo dessa convivência tão intensa. *“Doors closing - lift's going up!”*

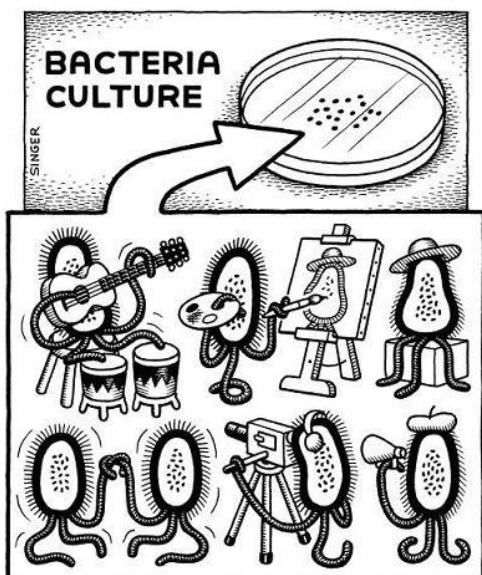
Ao professor Admir, por ter proporcionado meu primeiro contato mais profundo com o maravilhoso mundo dos microrganismos, por ter aceitado me orientar neste trabalho e estar sempre a disposição para me auxiliar.

Ao João, por ter primeiro me apresentado às esponjas, me incentivando e me mostrando como elas podem ser fantásticas!

Ao professor Rubens, pela admirável paciência e disposição pra compartilhar seu conhecimento e me auxiliar nos meus primeiros passos nesse caminho assustador e incrível da análise de sequências, até então desconhecido para mim.

E apesar de m(uu)itas ressalvas, não poderia deixar de agradecer à Dilmãe – por, em seu governo, ter me proporcionado a oportunidade de participar do Ciências sem Fronteiras. Não me faltam críticas ao modelo do programa, mas não posso deixar passar em branco as contribuições dele para minha formação acadêmica – sem isso, este trabalho também não seria possível.

E a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes ao longo da minha trajetória de formação como Bióloga, me incentivando e despertando, cada dia mais, a minha paixão por essa profissão maravilhosa. Meu muito obrigada!



RESUMO

Eponjas são um importante componente de ecossistemas bentônicos marinhos. Apresentam interações complexas com uma diversa e abundante comunidade de microrganismos, que vêm sendo alvo de muitas investigações devido a sua importância ecológica e biotecnológica. Os estudos relacionados à diversidade microbiana associada a esponjas têm se focado em técnicas independentes de cultura, avaliando a representatividade dos organismos presentes de forma quantitativa, a partir da amplificação e sequenciamento de DNA direto do tecido do animal. Este tipo de abordagem, embora importante, dificulta a exploração do potencial metabólico dos microrganismos, que entre muitas outras funções, vêm sendo apontados como importantes fontes de metabólitos secundários farmacologicamente ativos. Com o intuito de promover uma análise qualitativa, a diversidade bacteriana cultivável associada à esponja marinha *Hymeniacidon perleve*, coletada nas imediações do ancoradouro de Langstone, em Portsmouth, na Inglaterra, foi isolada através de técnicas tradicionais de cultura, e identificada pela análise molecular da subunidade 16S do RNA ribossômico. A diversidade da comunidade foi investigada filogeneticamente em relação a outros isolados e organismos provenientes de esponjas, através da comparação das sequências referentes aos isolados obtidos com sequências similares disponíveis em bancos de dados públicos. Um total de trinta microrganismos foram obtidos a partir de sete diferentes meios de cultura, distribuindo-se em nove filos, doze classes, dezessete ordens, catorze famílias, catorze gêneros e dez clados de classificação incerta. O filo Proteobacteria foi o mais numeroso entre os isolados, com quinze microrganismos reconhecidos como pertencentes ao táxon, apresentando também a maior diversidade de classes, ordens e famílias, seguido de Actinobacteria, com sete isolados. O filo Chloroflexi apresentou dois isolados pertencentes a uma única classe, e os demais filos foram representados por apenas um isolado cada. Aspectos taxonômicos, funcionais, metabólicos e biotecnológicos de cada um dos microrganismos presentes são discutidos com base na literatura publicada, de modo a identificar importantes características a serem investigadas em pesquisas futuras. Composto a diversidade obtida encontram-se organismos com potencial para a produção de substâncias de interesse farmacológico, representantes de táxons propostos que ainda não foram validados devido a falta de indivíduos cultivados, espécies esponja-específicas e microrganismos que apresentam vias metabólicas de importância funcional não apenas para a esponja, mas para diversos processos ecológicos no ambiente marinho. Essa grande diversidade de filos e repertórios de atividades indicou a *Hymeniacidon perleve* como um importante modelo para estudos relacionados à caracterização de comunidades microbianas associadas ao filo Porifera.

Palavras-chave: Porifera. Microbiota. Taxonomia bacteriana. RNA ribossômico 16S.

ABSTRACT

Sponges are important elements in benthic marine ecosystems. They present complex interactions with diverse and abundant microbial communities, which have been investigated due to its ecological and biotechnological relevance. Studies related to sponge-associated microorganisms have been focused on culture independent techniques, assessing the representativeness of the present organisms in a quantitative way, through amplification and sequencing straight from animal tissue. However important, this kind of approach difficulties the exploration of the metabolic potential of microorganisms, which among many other functions, have been pointed as important sources of pharmacologically active secondary metabolites. With the aim of promoting a qualitative analysis on the topic, the bacterial diversity associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve*, collected from Langstone Harbour, in Portsmouth, England, was isolated using traditional culturing techniques, and identified through molecular analysis of the 16S small subunit of ribosomal RNA. The community structure was analysed phylogenetically regarding other isolates and organisms retrieved from sponges, through comparison of the obtained samples with similar sequences available in public databases. A sum of thirty microorganisms were retrieved from seven different culture media, and have been assigned to nine phyla, twelve classes, seventeen orders, fourteen families, fourteen genera and ten clades of incertain classification. The phylum Proteobacteria were the most numerous between the isolates, with fifteen microorganisms assigned to the taxon, and have shown the greatest diversity of classes, orders and families, followed by Actinobacteria, with seven isolates. The phylum Chloroflexi presented two isolates belonging to one single class, and the other phyla were represented by one isolate each. Taxonomic, functional, metabolic and biotechnological aspects of each strain are discussed based on published literature, in order to identify important features to be investigated in further research. The diversity included potentially producers of pharmacological interesting compounds, organisms belonging to proposed taxa that have not yet been validated due to the lack of cultivated representatives, sponge-specific species and microorganisms presenting interesting metabolic pathways, both for the sponge itself and for several ecological processes in marine habitats. This huge diversity of phyla and activity repertoires indicated *Hymeniacidon perleve* as an important model for studies on the characterization of microbial communities associated with the phylum Porifera.

Keywords: Porifera. Microbiota. Bacterial taxonomy. 16S ribosomal RNA.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Representatividade dos filós de Bacteria aos quais foram atribuídos, pelo SINA online, os trinta microrganismos cultiváveis obtidos a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> | 37 |
| Figura 2. Diversidade cultivável de Proteobacteria obtida a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> | 37 |
| Figura 3. Diversidade cultivável de Actinobacteria obtida a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> | 38 |
| Figura 4. Filograma (<i>Neighbor-Joining</i>) dos microrganismos cultiváveis obtidos a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> , com os resultados de maior similaridade encontrados entre sequências de isolados, depositadas na base de dados do RDP | 46 |
| Figura 5. Filograma (<i>Neighbor-joining</i>) dos microrganismos cultiváveis obtidos a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> , com os resultados de maior similaridade encontrados entre sequências provenientes de esponjas, depositadas no GenBank | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1. Identificação taxonômica dos organismos obtidos a partir da esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> em diferentes meios de cultura, de acordo com a sequência de referência de maior porcentagem de similaridade obtida pelo SINA online | 36 |
| Tabela 2. Identificação taxonômica dos organismos isolados utilizados para construção da árvore filogenética da Figura 4. | 47 |
| Tabela 3. Identificação taxonômica dos organismos derivados de esponjas utilizados para construção da árvore filogenética da Figura 5. | 51 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 OBJETIVOS | 21 |
| 1.1.1 Objetivo Geral | 21 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos | 21 |
| 2. CONTEXTUALIZAÇÃO | 23 |
| 2.1 CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA | 23 |
| 2.2 FILO PORIFERA | 25 |
| 2.2.1 Características Gerais | 25 |
| 2.2.2 <i>Hymeniacidon perleve</i> | 26 |
| 2.3 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A ESPONJAS | 27 |
| 2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO | 29 |
| 3. METODOLOGIA | 31 |
| 3.1 COLETA | 31 |
| 3.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS | 31 |
| 3.3 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO | 31 |
| 3.4 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR | 32 |
| 3.5 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA | 32 |
| 3.6 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E DIVERSIDADE | 35 |
| 4.2 CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS | 38 |
| 4.2.1 <i>Proteobacteria</i> | 38 |
| 4.2.2 <i>Actinobacteria</i> | 42 |
| 4.2.3 Outros Filos | 43 |
| 4.3 FILOGENIA | 44 |
| 4.3.1 A problemática da seleção de sequências | 44 |
| 4.3.2 Relação com outros organismos isolados | 45 |
| 4.3.3 Relações com outros organismos provenientes de esponjas | 49 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 53 |
| 6. REFERÊNCIAS | 55 |

| | |
|--|----|
| APÊNDICE I. Formulação dos meios de cultura utilizados para o Isolamento de organismos cultiváveis associados à esponja <i>Hymeniacidon perleve</i> | 63 |
|--|----|

1 INTRODUÇÃO

Eponjas são os mais antigos metazoários ainda presentes no planeta (VAN SOEST *et al.*, 2012), e apesar de possuírem uma morfologia bastante simples, seu sucesso evolutivo é notável. As mais de oito mil espécies descritas distribuem-se ao longo de todas as latitudes, em diversas profundidades, e representam importantes elementos de comunidades bentônicas marinhas. Suas contribuições para os processos ecológicos nestes habitats incluem papéis estruturais, como consolidação, estabilização e regeneração do substrato em ambientes recifais, fornecimento de micro-habitats e camuflagem para outros organismos, e funções de natureza química e biológica, como ciclagem de carbono, fixação de nitrogênio, participação em outros ciclos biogeoquímicos e facilitação da produção primária (BELL, 2008).

A *Hymeniacidon perle* Montagu, 1814 (Classe Demospongiae, Ordem Halichondridae) é uma das espécies mais abundantes da costa britânica. Sua presença característica nas zonas de meso-litoral, áreas extremamente suscetíveis à influência direta da variação de marés, e seu sucesso de estabelecimento, mesmo em águas impactadas por forte ação antropogênica, tornam sua microbiota associada um interessante objeto de estudo. É comum que espécies residentes das zonas entremarés desenvolvam uma vasta gama de adaptações para contornar as fortes pressões exercidas por estes habitats, tais como competição por espaço, nutrientes e luz, amplas variações de umidade e temperatura e suscetibilidade à predação, e é de conhecimento geral a importância de relações simbióticas, sobretudo as que envolvem microrganismos, nestes ambientes. Poríferos possuem a maior diversidade de bactérias associadas em comparação com qualquer outro invertebrado marinho (WEBSTER *et al.*, 2010), e essas associações são frequentemente citadas como uma das razões para o sucesso evolutivo destes animais. Microrganismos vêm sendo amplamente apontados como responsáveis por diversas funções exercidas pelas esponjas, tais como nutrição, metabolismo de produtos residuais, ciclagem de carbono, nitrogênio e outras biomoléculas, resistência a *stress* ambiental e defesa química, através da produção de metabólitos secundários (FAN *et al.*, 2012).

Apesar de constituírem um sistema de grande valor para investigação das relações hospedeiro-simbionte, o estudo das comunidades microbianas associadas ao filo Porifera ainda é bastante inconspícuo quando comparado a outros grupos de função ecológica correlata, tais como corais formadores de recifes (BECERRO, 2008). Devido à complexidade e especificidade destas relações, é bastante provável que mudanças na composição destas comunidades afetem diretamente a saúde e o funcionamento da esponja, sua resiliência a predação e patogenicidade e, conseqüentemente, seu papel ecológico em ecossistemas bentônicos (WEBSTER; BLACKALL, 2009), o que torna a caracterização de sua microbiota uma importante ferramenta para avaliação, projeção e prevenção de danos aos ecossistemas marinhos.

A biomassa referente aos microrganismos associados a esponjas pode chegar a 40% do volume total do animal (WEBSTER; TAYLOR, 2012). No

entanto, a fração de microrganismos cultiváveis representa menos de 1% de todas as espécies procariontes presentes em amostras de diversidade para qualquer ambiente (RASTOGI; SANI, 2011), e pode ser ainda menor (entre 0.001 e 0.1%) para ambientes marinhos (COWAN, 2000), ou seja, a vasta maioria das espécies bacterianas, apesar de ativas e funcionais em seus ambientes naturais, não são capazes de se desenvolver sob condições artificiais em laboratório, constituindo a parcela conhecida como viável mas não cultivável. Em consequência disso, a enorme diversidade de microrganismos reportada para esponjas é majoritariamente estudada por técnicas independentes de cultura, que promovem o levantamento das comunidades a partir de amostras ambientais, havendo poucos registros de organismos cultivados. Ainda assim, os métodos baseados em cultura apresentam uma importante ferramenta, sobretudo quando objetiva-se a exploração do potencial biotecnológico de microrganismos, por permitir a identificação de características fisiológicas e manutenção destes para produção e extração de compostos de interesse. Muitas das substâncias de biodefesa produzidas por microrganismos associados a esponjas apresentam atividades farmacológicas de interesse, de modo que o foco na comunidade bacteriana cultivável é um importante passo para pesquisas nesse âmbito.

Independente do uso de técnicas tradicionais de cultivo para o isolamento de microrganismos, ainda se faz necessária a utilização de técnicas moleculares para a identificação taxonômica destes, uma vez que aspectos morfológicos e fisiológicos das culturas são frequentemente insuficientes e/ou não confiáveis para obtenção de uma classificação satisfatória (por serem extremamente variáveis em função das características do meio utilizado e de fatores bióticos e abióticos durante o desenvolvimento da colônia). O gene codificante para o RNA ribossômico 16S (RNAr 16S), componente da subunidade 30S de ribossomos procarióticos, têm sido a sequência mais comumente utilizada para análises taxonômicas e filogenéticas de procariotos, devido a características como: 1) universalidade de distribuição e elevado grau de conservação entre diferentes grupos; 2) significativa variabilidade em diferentes regiões da molécula; 3) facilidade de sequenciamento, devido ao seu pequeno tamanho (em torno de 1500 pares de base) e 4) ampla disponibilidade de sequências para comparação, de forma acessível e gratuita, em bases de dados públicas como o GenBank.

Assim sendo, torna-se evidente que técnicas tradicionais e moleculares são complementares, e não excludentes, já que fornecem informações distintas sobre a comunidade a ser estudada e são utilizadas com objetivos diferentes. O presente estudo utilizou ambas as ferramentas para caracterizar a diversidade microbiana cultivável associada à esponja marinha *Hymeniacidon perlewe*, com o objetivo de reunir o maior número de informações possível a respeito desse importante componente biológico para a ecologia da esponja.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e descrever a comunidade microbiana cultivável associada à esponja marinha *Hymeniacidon perleve*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar, através de diferentes meios de cultura, microrganismos para posterior manutenção e uso;
- Identificar taxonomicamente os organismos isolados através da análise da sequência codificante para o RNAr 16S;
- Analisar filogeneticamente a diversidade da comunidade em relação a sequências similares disponíveis nos bancos de dados públicos.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA

A classificação bacteriana representa um desafio no campo da Sistemática por esbarrar em pilares fundamentais da Taxonomia. O processo de categorização taxonômica baseia-se no conceito-chave de *espécie*, a partir do qual os organismos podem ser agrupados em uma série de subdivisões que seguem uma hierarquia. Essa estrutura foi definida por Carl von Linné em sua obra *Systema Naturae* em 1735, tendo fundamentado as bases da classificação biológica a partir de estudos com plantas e animais. O conceito clássico de espécie biológica utilizado por botânicos e zoólogos, porém, não é conveniente para organismos procarióticos, por basear-se na capacidade de intercruzamento entre os indivíduos. A reprodução bacteriana não está diretamente ligada ao processo sexuado típico de eucariotos, sendo infrequente e não necessariamente espécie-específica. Entretanto, não há um conceito universal para espécies procarióticas. Diferentes definições são utilizadas dependendo da abordagem segundo a qual um microrganismo é estudado, podendo ser delimitadas, por exemplo, por características morfológicas (espécies taxonômicas) ou diferenças entre sequências de DNA (espécies genômicas) (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001).

A taxonomia de microrganismos é um exemplo muito representativo de uma área que sofreu modificações drásticas a medida que novas técnicas foram se tornando disponíveis. A princípio, a maioria dos cientistas envolvidos nesse campo tinha interesse em identificar apenas bactérias causadoras de doenças para humanos (grande parte das espécies patogênicas conhecidas atualmente foi descrita entre 1880 e 1900), e nessa época, a morfologia da colônia, particularidades de crescimento e patogenicidade eram os principais caracteres taxonômicos utilizados (SCHLEIFER, 2009). No início do século XX diversas descobertas no campo da Bioquímica permitiram a incorporação de dados fisiológicos e bioquímicos às análises, como o uso de rotas metabólicas, a presença de enzimas e outros componentes celulares (sendo a estrutura da parede celular um dos exemplos mais significativos, permitindo o desenvolvimento do método de coloração de Gram). Até hoje muitos esquemas de identificação ainda se utilizam dessas características, sendo extremamente úteis para diagnósticos diferenciais. A descoberta da estrutura do DNA em 1953 impulsionou a elucidação dos mecanismos de replicação do material genético, fornecendo as bases para o desenvolvimento da Biologia Molecular, que representaria a maior revolução no campo da Taxonomia de microrganismos até então experienciada. Em 1975, Carl Woese descreveu a existência de domínios conservados na estrutura dos genes que codificam para o RNA ribossômico 16S (RNAr 16S, componente da subunidade 30S de cromossomos procarióticos) (WOESE *et al.*, 1975), e primeiramente propôs o uso dessa molécula como marcador filogenético, descoberta que, dois anos depois, culminaria na polêmica proposta da existência de três grandes domínios para a classificação biológica. No sistema proposto por

Woese, atualmente muito bem consolidado, o grupo Archaeobacteria (anteriormente posicionado como uma divisão no reino Bacteria) foi primeiramente classificado como um reino à parte (WOESE; FOX, 1977).

Desde então, as sequências para o rRNA 16S têm sido os marcadores genéticos mais amplamente utilizados para identificação de microrganismos. Estão presentes em todas as bactérias, frequentemente como famílias de genes, e sua estrutura e função é extremamente conservada entre diferentes grupos taxonômicos, o que indica que pequenas modificações nessas sequências são um indicativo bastante confiável para medição de distâncias evolutivas. Essas modificações, no entanto, não são capazes de proporcionar uma boa resolução para o nível de espécie, sendo as técnicas de hibridização DNA-DNA o padrão para proposição de novas espécies e reclassificação de microrganismos com propriedades ambíguas (JANDA; ABBOTT, 2007). Ainda assim, o fato de ser uma molécula bastante pequena (em torno de 1500 pares de bases) e, consequentemente, os custos de seu sequenciamento serem consideravelmente mais baixos do que os de genomas completos, faz com que as análises comparativas entre sequências de rRNA 16S sejam largamente utilizadas para reconstrução de relações filogenéticas entre procariotos (YARZA *et al.*, 2008). Além disso, o seu uso proporcionou, pela primeira vez, análises mais detalhadas da diversidade de comunidades complexas, sem depender dos meios de cultura tradicionais. Há muito se debatia sobre a discrepância entre os números de contagem direta de células e de espécies cultiváveis de bactérias recuperadas de amostras ambientais, indicando que apenas uma parcela muito pequena de todos os organismos presentes era capaz de se desenvolver sob condições artificiais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). As técnicas atuais permitem que o material genético seja recuperado diretamente do ambiente e que sequências de interesse sejam amplificadas para análise sem a necessidade de cultivar o microrganismo. Em consequência disso, o número de sequências depositadas em bancos de dados públicos tem crescido exponencialmente nos últimos dez anos, atualmente excedendo os quatro milhões, de acordo com a última atualização do SILVA rRNA Database Project (PRUESSE *et al.*, 2013).

Esta gigantesca disponibilidade de informações para consulta e comparação traz algumas consequências para o campo da Taxonomia. A principal delas é que a maior parcela desse material corresponde a indivíduos não cultivados, levantando a problemática da proposição de novas espécies com base apenas nas diferenças entre sequências de DNA. Um conceito frequentemente aplicado é o de Unidade Taxonômica Operacional (OTU, do inglês *Operational Taxonomic Unit*) (BLAXTER *et al.*, 2005), onde a porcentagem de similaridade entre sequências é utilizada para quantificar a diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, por exemplo. No entanto, diretrizes gerais para a proposição de novas espécies, indicadas pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos, recomendam que uma espécie genotípica (OTU) não seja validada até que possa ser diferenciada por alguma propriedade fenotípica, o que só pode ser alcançado quando houver um representante isolado a partir do qual seja possível descrever características morfológicas e fisiológicas. Como ainda não há

um método unificado para classificar e nomear os táxons identificados por OTUs (mas ver YARZA *et al.*, 2014), muitos destes grupos não possuem uma posição clara na escala hierárquica da taxonomia lineana, sendo comumente referenciados apenas como “clados” 16S. Estes agrupamentos não consolidados podem ocorrer em todos os níveis de classificação. Por exemplo, o clado marinho SAR202 pertence ao filo Chloroflexi, mas não é considerado uma Classe uma vez que não há nenhum organismo descrito com detalhes suficientes para definir um gênero (e, consequentemente, para definir um conjunto de gêneros – família – e um conjunto de famílias – ordem). O mesmo acontece com o clado marinho SAR86, que por sua vez pertence à Ordem Oceanospirillales, mas pelos mesmos motivos não pode ser definido como uma Família. Quando um organismo demonstra uma íntima relação filogenética com um táxon conhecido, mas ainda não foi suficientemente caracterizado para ser classificado como tal, ele é nomeado como “*Candidatus*” seguido do nome do táxon ao qual acredita-se que ele pertence. Essa nomenclatura extra-oficial foi definida por Murray e Schleifer (1994) em uma nota taxonômica, sendo estas definições de grande importância para o presente trabalho, uma vez que alguns organismos analisados se encaixam em categorias como estas.

2.2 FILO PORIFERA

2.2.1 Características Gerais

Eponjas são os mais antigos metazoários ainda presentes em nosso planeta. Eram comumente posicionadas em uma subdivisão de Metazoa (=Animalia), o subreino Parazoa, no qual seriam o único filo representante, diferindo dos demais integrantes do reino (denominados Eumetazoários) pela falta de organização das células em tecidos verdadeiros. A definição de um tecido verdadeiro baseia-se na composição proteica da membrana basal de organismos multicelulares, e seu componente principal, o colágeno tipo IV, está presente em todos os metazoários, exceto poríferos, um fato bastante intrigante uma vez que estes apresentam um epitélio bem definido. A presença desta proteína, contudo, foi detectada em um grupo de esponjas (Homoscleromorpha), evidenciando a ubiquidade da estrutura da membrana basal em todos os animais, mas levantando a hipótese de parafilia do filo Porifera, uma vez que seus demais representantes não possuem colágeno tipo IV (BOUTE *et al.*, 1997). Desde então, a taxonomia do grupo vem sendo largamente debatida (BORCHIELLINI *et al.*, 2001; SPERLING; PETERSON; PISANI, 2009; GAZAVE *et al.*, 2012) e atualmente, considera-se as esponjas entre os metazoários verdadeiros. São distribuídas em quatro classes (Calcarea, Hexatinellida, Demospongiae e Homoscleromorpha), e apesar de possuírem um bauplan bastante rudimentar, constituem um filo bastante diverso, extremamente bem sucedido e eficiente. As mais de oito mil espécies reconhecidas até 2012 (VAN SOEST *et al.*, 2012) têm distribuição praticamente cosmopolita, sendo capazes de habitar tanto ambientes marinhos como de água-doce, ao longo de regiões tropicais, temperadas e polares em

diversas profundidades, e acredita-se que a diversidade real ainda a ser descoberta é de pelo menos o dobro desse número (VAN SOEST *et al.*, 2012).

São organismos exclusivamente aquáticos, sésseis e filtradores, sem plano de simetria definido e de organização corporal extremamente simples, composta por conjuntos celulares especializados para as funções vitais do animal, sem no entanto formar tecidos ou órgãos. Sua superfície externa é composta por células denominadas pinacócitos, que também revestem a superfície interna dos sistemas de canais e câmaras para passagem de água. O interior desse sistema é formado por linhas de células flageladas, os coanócitos, responsáveis por gerar o fluxo de água necessário para a atividade filtradora das esponjas, lhes garantindo alimento e trocas gasosas. O espaço entre a pinacoderme e a coanoderme é preenchido por uma matriz extracelular composta basicamente por colágeno (o meso-hilo), onde estão alojadas as espículas e outros tipos celulares, como amebócitos (digestão intracelular e distribuição de gases e nutrientes) e esclerócitos (formação e secreção das espículas). É também no meso-hilo onde se acredita que esteja distribuída uma rica e diversa comunidade de microrganismos.

2.2.1 *Hymeniacidon perleve*

A *Hymeniacidon perleve* Montagu, 1814 (Classe Demospongiae, Ordem Halichondridae) trata-se de um organismo incrustante de presença característica na zona entremarés, comumente encontrada completa ou parcialmente exposta na margem inferior de costões rochosos durante a maré baixa. Coloniza uma variedade de superfícies, desde rochas expostas, algas (frequentemente associada a *Laminaria* spp) ou sedimento arenoso/argiloso, podendo ser encontrada em diferentes condições de turbidez e salinidade. A coloração varia entre matizes de amarelo e laranja nas formas mais próximas à costa, podendo atingir um vermelho intenso em maiores profundidades. A forma de crescimento e a coloração são diversificadas de acordo com a exposição à costa, podendo variar de finas lâminas em baixas e médias marés, a grandes aglomerados em torre em águas mais profundas, protegidas da ação das ondas (ACKERS *et al.*, 2007). Sua distribuição é limitada ao Atlântico Norte e ao Mediterrâneo de acordo com o *World Porifera Database*, embora existam alguns registros não confirmados na costa da África, Nova Zelândia e no Mar Amarelo, na China. São capazes de colonizar áreas fortemente impactadas por ação humana, despertando interesse para estudos relacionados às adaptações desenvolvidas por estes animais para permitir tamanha versatilidade. A população analisada no presente trabalho apresenta a forma incrustante típica de baixas profundidades, formando tapetes de não mais que 10cm de espessura cobrindo a superfície de plataformas de cimento presentes no local da coleta, o ancoradouro natural de Langstone, em Portsmouth, na Inglaterra. Trata-se de uma enseada de águas rasas e substrato lodoso, fortemente influenciada pela atividade da maré, além de bastante impactada por ação antropogênica, relacionada principalmente à navegação, tanto comercial (ligada à pesca) como recreativa. O local foi utilizado como base naval durante a Segunda

Guerra Mundial, possuindo uma variedade de destroços relacionados à atividade bélica naquela época, como restos de navios e plataformas de cimento, utilizadas para construção e manutenção de embarcações. Essas estruturas, já incorporadas ao ecossistema local, abrigam uma fauna característica de costões rochosos, apesar de a área ser classificada como “pastagem litoral pantanosa”, de acordo com o Solent Forum. Além das espécies típicas deste ecossistema (cuja diversidade está diretamente relacionada à presença de leitos de *seagrass*¹), estão comumente presentes moluscos de várias espécies (incluindo as exploradas comercialmente, como ostras e mexilhões), artrópodes (lagostas e camarões), cnidários (principalmente na forma de pólipos), briozoários e esponjas, que se beneficiam diretamente da superfície dos destroços para seu estabelecimento. Essas características chamam a atenção para as populações de *H. perleve* que habitam o local, uma vez que, para serem capazes de colonizar este ambiente tão particular, é esperado que possuam adaptações importantes, entre elas o desenvolvimento de interações com microrganismos, tendo em vista como estas associações podem influenciar a capacidade adaptativa destes animais.

2.3 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A ESPONJAS

Ao mesmo tempo em que a biologia sésil e filtradora das esponjas as tornam extremamente suscetíveis a adversidades ambientais, tais como competição por espaço, nutrientes e oxigênio, exposição a poluentes e predação, essa morfologia favorece uma íntima associação com microrganismos, frequentemente associados ao sucesso ecológico e evolutivo desses animais.

A comunidade simbiótica² associada a esponjas está entre as mais abundantes e diversas encontradas para qualquer outro invertebrado marinho (WEBSTER *et al.*, 2010), e essa diversidade vem sendo alvo de numerosos estudos com os mais diferentes enfoques. Muitos deles exploram os microrganismos como auxiliares de várias funções exercidas pelas esponjas, tais como nutrição, metabolismo de produtos residuais, participação no ciclo do nitrogênio e resistência a *stress* ambiental. A natureza dessas relações, evolutiva e funcionalmente, foi explorada por Fan e colaboradores (2012) resultando num compilado que pode ser consultado para os diversos trabalhos nessa área até o momento. Além das evidentes funções para a biologia da esponja, muitos estudos apontam a importância de conhecer, qualitativa e quantitativamente, estes

¹ “*Seagrass*” é o nome popular adotado para algumas famílias de monocotilêneas adaptadas à vida marinha. Ocorrem em águas rasas de ambientes costeiros, estuários e lagoas, formando extensas pradarias que são consideradas um dos ecossistemas mais produtivos do planeta.

² O termos “simbiose” e “simbionte” serão utilizados neste trabalho da mesma forma aplicada por Taylor *et al.*, (2007) e adotada por Montalvo e Hill (2011). Nestes trabalhos, a associação simbiótica se assemelha àquela pioneiramente definida por de Bayer (1879 *apud* SAPP, 2010), referindo-se simplesmente a dois organismos que vivem intimamente associados por um longo período de tempo, sem qualquer implicação quanto a natureza benéfica ou nociva da relação para os envolvidos.

microrganismos, como ferramenta para avaliação, projeção e prevenção de danos aos ecossistemas marinhos. A composição das comunidades simbiotes perante a mudanças de temperatura, iluminação, qualidade da água e outros parâmetros é estudada com esse intuito. Chama a atenção o trabalho de Lemoine e colaboradores (2007) que avaliaram a comunidade associada à esponja *Halicondria bowerbanki* como modelo para estudos relacionados a mudanças climáticas, observando que a composição de espécies presentes na esponja sofreu alterações quando submetida a temperaturas mais altas, correspondentes às projeções para a temperatura superficial dos oceanos para daqui 50 e 100 anos.

Outro enfoque bastante prolífico na área é o da biogeografia e especificidade das relações. Ao explorar uma comunidade microbiana associada a qualquer espécie de esponja, muitos questionamentos são levantados de maneira praticamente intrínseca: quais destes microrganismos podem ser, de fato, considerados simbiotes? São encontrados exclusivamente associados a esponjas (ou, mais especificamente, apenas àquela espécie de esponja), ou podem estar distribuídos em outros ambientes e organismos? Como a distribuição geográfica pode estar associada à composição dessas comunidades? Estas questões vêm sendo abordadas há pelo menos três décadas, quando Vacelet e Donadey (1975 *apud* TAYLOR *et al.*, 2007) inicialmente observaram que esponjas podiam ter uma microbiota específica, propondo três associações possíveis entre microrganismos e estes hospedeiros: populações esponja-específicas abundantemente distribuídas no meso-hilo do animal, pequenas populações de bactérias intracelulares, e populações genéricas também encontradas na água do entorno. Mais tarde, seus estudos foram corroborados e aprimorados por diversos autores, entre os quais se destacam Wilkinson (1978), que constatou que esponjas taxonomicamente distantes abrigavam uma comunidade muito semelhante entre si, que diferia daquela encontrada na água ambiente, e através de ensaios imunológicos, demonstrou que essa microbiota específica datava do pré-Cambriano (WILKINSON, 1984). Hentschel e colaboradores (2002) atualizaram o conceito de Vacelet para incluir noções moleculares, definindo uma população esponja-específica como: grupos derivados de esponjas com pelo menos três sequências de rRNA 16S que: a) sejam mais semelhantes entre si do que sequências de outras fontes; b) sejam encontradas em pelo menos duas espécies de esponja, ou na mesma esponja em localidades diferentes e c) se agrupem independente do método de inferência filogenética utilizado. Com base nesta definição, muitos estudos posteriores identificaram populações equivalentes em esponjas completamente não relacionadas, taxonômica ou geograficamente (MONTALVO; HILL, 2011; SCHMITT *et al.*, 2012; PITA; LÓPEZ-LEGENTIL; ERWIN, 2013). A partir destas constatações, surge um dos questionamentos mais interessantes da área: se a origem dessas associações são tão antigas como parecem ser, podendo ter se iniciado mesmo antes da própria irradiação das esponjas, de que forma se deu (e como se mantém) a aquisição dos microrganismos por seus hospedeiros? Como o filo Porifera é o grupo mais antigo e conservado do reino animal, o estudo das relações simbiote-hospedeiro em seus representantes também pode refletir o histórico evolutivo das associações de

metazoários com microrganismos. Embora alguns estudos tenham evidenciado a existência de transmissão vertical (ERESKOVSKY; GONOBLEVA; VISHNYAKOV, 2005; SHARP *et al.*, 2007; ON *et al.*, 2009), essa questão ainda é muito debatida, e uma variedade de outros mecanismos de transmissão são investigados (TAYLOR *et al.*, 2007; WEBSTER *et al.*, 2010).

Diante de tantos questionamentos e implicações possíveis, torna-se evidente como o estudo da microbiota associada a esponjas é um campo crescente e de grande relevância para muitas áreas do conhecimento, mas sem dúvida o maior interesse atualmente é a exploração biotecnológica desses microrganismos.

2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Há pelo menos três décadas o filo Porifera lidera como fonte de isolamento de bioprodutos derivados de ambientes marinhos (BLUNT *et al.*, 2005). A hipótese de que essas substâncias sejam, na verdade, provenientes de microrganismos simbiotes vem sendo bastante explorada (BEWLEY; FAULKNER, 1998; WANG, 2006) e, de fato, bactérias isoladas de esponjas demonstraram produzir os mesmos compostos que antes haviam sido extraídos do próprio animal (STIERLE; CARDELLINA; SINGLETON, 1988; BEWLEY; HOLLAND; FAULKNER, 1996). É didaticamente inviável referenciar o gigantesco número de artigos que exploram o potencial biotecnológico dessas associações e os numerosos relatos de substâncias de interesse farmacológico isolados a partir delas. Boas revisões neste tópico foram produzidas por Mehbub e colaboradores (2014) e Laport, Santos e Muricy (2009), e um relatório anual é publicado pela *Royal Society of Chemistry* em uma edição especial da revista *Natural Product Reports*, nomeada *Marine Natural Products*, retratando as descobertas feitas nessa área.

Apesar desse gigantesco potencial, é importante salientar, contudo, que até a presente data nenhum dos produtos derivados de esponjas ou de seus simbiotes chegou às prateleiras. Entre as drogas com potencial anticancerígeno (um dos principais e mais prolíficos ramos de interesse), apenas onze chegaram à fase de testes clínicos até 2010, e dessas, apenas duas foram aprovadas para administração em humanos (SHAKERI; SAHEBKAR, 2015). Um dos maiores obstáculos para a aprovação, não apenas de compostos derivados de esponjas, mas de qualquer outro organismo marinho, é a dificuldade de fornecimento, já que a disponibilidade dessas substâncias é bastante limitada nos ecossistemas (questão discutida em detalhes por Proksh, Edrada e Ebel, 2002). Diante dessa problemática, torna-se evidente a importância dos estudos com microrganismos capazes de serem cultivados em laboratório, já que a identificação de compostos metabolicamente ativos a partir de amostras ambientais não garante sua produção em larga escala.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA

As amostragem foi realizada nas imediações do Ancoradouro de Langstone, em Portsmouth, na Inglaterra. A cidade localiza-se no litoral sul do país e faz parte do complexo sistema banhado pelo estreito de Solent, que separa a Ilha de Wight da costa britânica. O sistema inclui o estuário Southampton Water e os três ancoradouros naturais de Chichester, Langstone e Portsmouth. O clima da região é temperado oceânico (*Cfb*, segundo a classificação de Köppen), marcado por temperaturas não muito quentes no verão (entre 15°C e 22°C) nem muito frias no inverno (entre 10°C e 5°C), raramente caindo abaixo do ponto de congelamento ou presenciando neve.

O material para análise foi coletado durante o mês de Junho de 2014, em períodos de maré baixa, a partir de populações que se desenvolvem na superfície de plataformas de cimento abandonadas no local. Fragmentos de aproximadamente 10cm² de três espécimes diferentes foram removidos manualmente com o auxílio de um bisturi, e levados para o laboratório de Microbiologia da Universidade de Portsmouth. Um galão de vinte litros de água do mar das imediações também foi recolhido para produção de meios de cultura.

3.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram manipuladas no dia da coleta, com material ainda fresco. Tomou-se o cuidado para remover a porção exterior do tecido esponjoso, mantendo apenas o cerne da estrutura, e as fatias obtidas foram intesamente enxaguadas com água destilada, de modo a minimizar a permanência de organismos transeuntes. Os fragmentos dos três espécimes foram mascerados em três tubos de ensaio diferentes contendo água do mar esterilizada e, partir do sumo obtido, uma série de diluições decimais foi conduzida. Das soluções resultantes, as com concentração 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram utilizadas para inoculação.

3.3 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

Uma série de meios de cultura com características distintas quanto à disponibilidade de nutrientes foi inoculada com 100µL das diluições obtidas para cada amostra, resultando em nove placas para cada meio utilizado (sendo três réplicas de cada uma das diluições). Os sete meios utilizados foram: Ágar-Água do Mar, Ágar-Água do Mar 10%, Ágar Marinho e Caldo de Esponja para isolamento de bactérias totais, e Ágar Batata Dextrose, Ágar Extrato de Levedura e Amido e Agar Isolamento de Actinobacteria, como meios específicos para isolamento de Actinobactérias. As respectivas fórmulas para cada meio de cultura estão descritas no Apêndice I. A utilização de diferentes meios de cultura teve o intuito de fornecer condições para microrganismos com requerimentos energéticos distintos, de modo a maximizar a diversidade a ser obtida.

Todos os meios de cultura devidamente inoculados foram incubados a 20°C, temperatura semelhante à da água do mar durante a estação em que foram realizadas as coletas. Devido às condições muito distintas fornecidas por cada um dos diferentes meios e às características extremamente variadas dos microrganismos que esperava-se obter em cada um, era provável que as colônias comesçassem a aparecer e atingissem o crescimento mínimo necessário para análise em tempos muito diferentes. Deste modo, as culturas foram verificadas diariamente para o aparecimento de novas colônias, das quais se tomou-se nota, sem definir-se um limite de tempo de incubação.

3.4 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR

Os microrganismos obtidos durante a incubação foram selecionados de acordo com a morfologia externa da colônia (coloração, textura, formato) para serem analisados microscopicamente pelo método de coloração de Gram. Aspectos como a organização microscópica das células (isoladas, filamentosas, agrupadas), formato (esféricas, baciliformes, vibriformes), tamanho e presença de estruturas intracelulares, além do resultado do Gram, foram utilizados para distinguir as culturas que de fato representavam organismos diferentes, e estas foram isoladas para o meio de cultura no qual melhor se desenvolveram inicialmente. Após 48 horas de incubação, cada uma das culturas puras adquiridas através desse procedimento foi transferida em duplicata para tubos *Eppendorf* contendo glicerol na concentração de 50%. Um dos conjuntos foi armazenado a -80°C para estudos posteriores, e o outro destinado a extração de DNA para análise molecular.

3.5 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA³

O material para análise foi obtido por procedimentos padrão para extração de DNA, e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do fragmento de interesse (RNAr 16S) foi realizada de acordo com a metodologia descrita em (WEBSTER; WATTS; HILL, 2001), utilizando os primers universais para amplificação de RNAr 16S de procariotos: 8f 3'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5', e 1542r 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3' (EDWARDS *et al.*, 1989). As amostras foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger para o grupo LGC Genomics, em Teddington, Middlesex, com recursos da *Natural Resource Wales*.

3.6 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

³ Os procedimentos descritos neste item foram realizados pela acadêmica Rebecca Herne, da Universidade de Portsmouth, sob a orientação da Prof^a Dr^a Joy E. M. Watts, em parceria com a School of Biological Sciences da Universidade de Portsmouth. Os resultados foram gentilmente concedidos para a realização deste trabalho.

A taxonomia dos organismos foi inferida através do SINA *online* (PRUESSE; PEPLIES; GLÖCKNER, 2012), ferramenta de alinhamento e busca por sequências similares nos bancos de dados do SILVA *rRNA Database Project* (PRUESSE *et al.*, 2013), selecionando a opção “*Search and Classify*”. A busca foi realizada contra a biblioteca de RNAr 16S e configurada para resultar em uma única sequência de referência com similaridade superior a 95% com a sequência-alvo, porcentagem referida como base para inferência taxonômica a nível de gênero segundo Webster *et al.*, (2010). As sequências que não puderam ser identificadas a nível de gênero tiveram sua taxonomia inferida a nível de família (mínimo de 90% de similaridade), ordem (85%) e classe (80%), de acordo com a mesma metodologia.

Dois conjuntos de sequências foram selecionadas, a partir de bancos de dados públicos, para análise filogenética comparativa: 1) sequências de maior porcentagem de similaridade com as sequências-alvo provenientes de culturas isoladas, obtidas através da ferramenta *SeqMatch*, do *Ribosomal Database Project* (COLE *et al.*, 2013), e 2) sequências de maior porcentagem de similaridade com as sequências-alvo derivadas de esponjas, selecionadas através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do GenBank (BENSON *et al.*, 2012), utilizando a biblioteca de RNAr 16S e limitando a busca através do algoritmo “(sponge* or porifera*) and (16S* or ssu* or rRNA*)” no campo “*Entrez query*”.

O alinhamento entre as sequências obtidas e os dois conjuntos escolhidos foi realizado pelo SINA *online* e editado através do *software* Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009) para remoção dos *gaps* em comum. Os arquivos resultantes foram utilizados para construção de árvores filogenéticas pelo *software* ARB (LUDWIG *et al.*, 2004), e posteriormente editadas pelo *software* FigTree (MORARIU *et al.*, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA DIVERSIDADE

Um total de trinta isolados foram selecionados para análise molecular a partir dos sete meios de cultura utilizados, sendo nomeados de acordo com o nome do meio no qual obtiveram melhores taxas de crescimento (estimadas pelo número de unidades formadoras de colônia). A relação de organismos obtidos a partir de cada meio de cultura e seus códigos são:

- Ágar-Água do Mar – dois isolados (ASW1 e ASW2);
- Ágar-Água do Mar 10% – dois isolados (ASW10.1 e ASW10.2);
- Ágar Marinho – quatro isolados (MA1 a MA4);
- Ágar-Extrato de Levedura e Amido – seis isolados (SSW1 a SSW6);
- Ágar Isolamento de Actinomycetes – cinco isolados (AIA1 a AIA5);
- Ágar-Batata-Dextrose – onze isolados (PD1 a PD11).

Todos os isolados foram identificados, pelo menos, a nível de filo e classe, vinte e oito a nível de ordem, vinte e três a nível de família e dezessete a nível de gênero. A classificação⁴ completa atribuída pelo SINA *online* para cada uma das amostras pode ser visualizada na Tabela 1.

A diversidade obtida compreendeu nove filos, doze classes, dezessete ordens, catorze famílias, catorze gêneros e ainda dez clados de classificação incerta, e a representatividade de cada filo para o total de organismos identificados encontra-se na Figura 1. Os dois filos mais numerosos entre as amostras foram Proteobacteria, com quinze isolados, e Actinobacteria, com sete isolados. A diversidade de classes, ordens e famílias dentro destes dois filos está detalhada nas Figuras 2 e 3. O filo Chloroflexi apresentou dois isolados pertencentes a uma única classe, e os outros filos foram representados por apenas um isolado cada, sendo, portanto, não retratados graficamente.

⁴ As tabelas e gráficos apresentados neste capítulo foram construídas com base na proposição taxonômica do Silva, e a classificação atribuída através da ferramenta *Search and Classify* do SINA *online* (ver sub-item 3.6) será utilizada ao longo da discussão. No entanto, algumas categorias às quais foram atribuídos certos organismos encontram-se em revisão, e estes casos serão aprofundados nas próximas seções.

Tabela 1 – Identificação taxonômica dos organismos obtidos a partir da esponja *Hymeniacidon perlewe* em diferentes meios de cultura, de acordo com a sequência de referência de maior porcentagem de similaridade obtida pelo *SINA online*. (*) Clados não consolidados.

| AMOSTRA | FILÓ | CLASSE | ORDEN | FAMÍLIA | GÊNERO | REFERÊNCIA | SIMILARIDADE (%) |
|---------|------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|------------------|
| AMOSTRA | | | | | | | |
| AM1 | Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces</i> | EU423873 | 99.68 |
| AM2 | Actinobacteria | Actinobacteria | Pseudonocariales | Pseudonocariaceae | <i>Actinoniloticus</i> | DQ144222 | 99.85 |
| AM3 | Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces</i> | DQ144228 | 99.01 |
| AM4 | Actinobacteria | Acidimicrobia | Acidimicrobiales | OM1* | <i>Candidatus Actinomirna</i> | AACV020462030 | 100 |
| AM5 | Actinobacteria | Acidimicrobia | Acidimicrobiales | Sva0996* | Não-classificado | DQ394994 | 88.65 |
| ASW1 | Proteobacteria | Betaproteobacteria | Hydrogenophiales | Hydrogenophiaceae | <i>Thiobacillus</i> | EU79965 | 91.31 |
| ASW2 | Bacteroidetes | Flavobacteria | Flavobacteriales | NS9* | Não-classificado | FR683582 | 87.28 |
| ASW10.1 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Oceanospirillales | SAR86* | Não-classificado | FR683589 | 99.77 |
| ASW10.2 | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | SAR11* | Não-classificado | Não-classificado | FR684750 | 99.64 |
| MA1 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Oceanospirillales | SAR86* | Não-classificado | FR683589 | 99.62 |
| MA2 | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | SAR11* | Não-classificado | Não-classificado | JK017034 | 99.9 |
| MA3 | Proteobacteria | Betaproteobacteria | Methylophilales | Methylophilaceae | OMA3* | JK233149 | 99.46 |
| MA4 | Cyanobacteria | Cyanobacteria | Subseção III | Família I | <i>Coleofasciculus</i> | JK002420 | 91.76 |
| PD1 | Actinobacteria | Actinobacteria | Corneliobacteriales | Nocardiaceae | <i>Rhodococcus</i> | FR750961 | 99.4 |
| PD2 | Proteobacteria | Deltaproteobacteria | Desulfobacteriales | Nitrospiraceae | <i>Candidatus Eritrotheurella</i> | AZHWO1000045 | 95.32 |
| PD3 | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacteriales | Rhodobacteriaceae | <i>Pseudovibrio</i> | DQ097248 | 99.54 |
| PD4 | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacteriales | Rhodobacteriaceae | <i>Pseudovibrio</i> | DQ097248 | 99.84 |
| PD5 | Gemmatimonadetes | Gemmatimonadetes | PAUC43* | Não-classificado | Não-classificado | AF186415 | 99.19 |
| PD6 | Deferribacteres | Deferribacteres | PAUC43* | PAUC44* | Não-classificado | F1900329 | 97.92 |
| PD7 | Cloroflexi | SAR202* | Não-classificado | Não-classificado | Não-classificado | F1900341 | 92.44 |
| PD8 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Oceanospirillales | Hahellaceae | <i>Endozoicomonas</i> | GU784983 | 92.88 |
| PD9 | Proteobacteria | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Burkholderiaceae | <i>Burkholderia</i> | HF678367 | 99.31 |
| PD10 | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacteriales | Rhodobacteriaceae | <i>Ruegeria</i> | JK411475 | 98.67 |
| PD11 | Actinobacteria | Acidimicrobia | Acidimicrobiales | Sva0996* | Não-classificado | KR61085 | 95.32 |
| SSW1 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Oceanospirillales | ZD0405* | Não-classificado | GU234872 | 97.5 |
| SSW2 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Pseudomonadales | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | JO665348 | 97.61 |
| SSW3 | Proteobacteria | Gammaaproteobacteria | Vibrionales | Vibrionaceae | <i>Vibrio</i> | JO408397 | 99.7 |
| SSW4 | Firmicutes | Bacilli | Bacillales | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> | JO665289 | 99.4 |
| SSW5 | Cloroflexi | SAR202* | Não-classificado | Não-classificado | Não-classificado | AF186417 | 99.18 |
| SSW6 | Planctomycetes | Planctomycetacia | Brocadiales | Brocadaceae | Não-classificado | AB281488 | 93.13 |

Figura 1. Representatividade dos filos de Bacteria aos quais foram atribuídos, pelo SINA *online*, os trinta microrganismos cultiváveis obtidos a partir da esponja *Hymeniacidon perleве*. A numeração representada no gráfico é referente ao número absoluto de isolados atribuídas a cada filo.

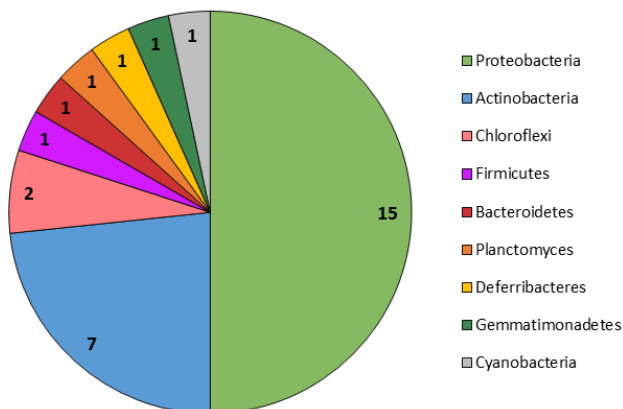


Figura 2. Diversidade cultivável de Proteobacteria obtida a partir da esponja *Hymeniacidon perleве*. Representatividade dos 15 isolados atribuídos ao filo pelo SINA *online*, distribuídos em 4 classes (círculo interior), 9 ordens (círculo intermediário, em negrito) e 11 famílias (círculo externo).

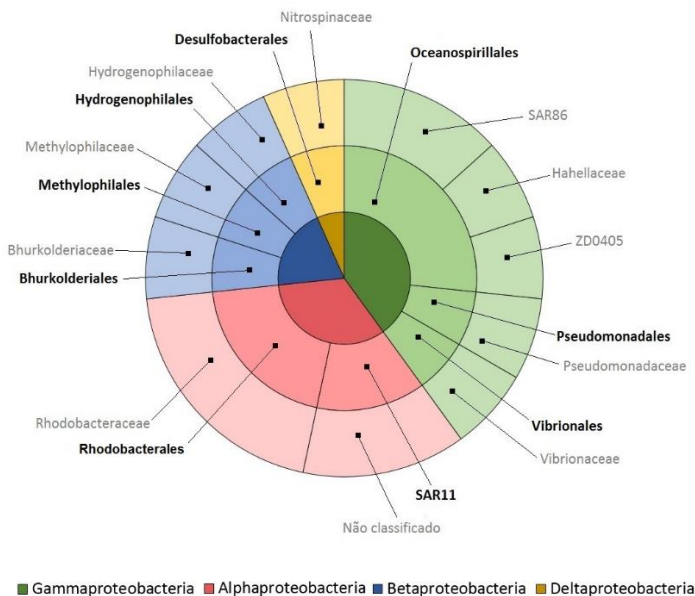
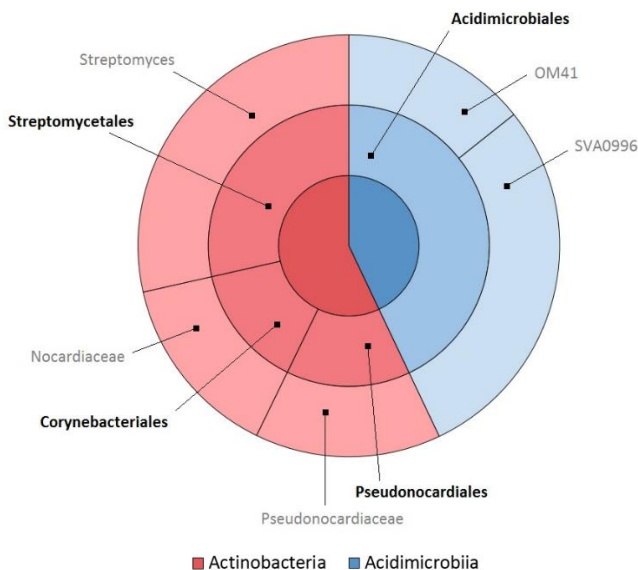


Figura 3. Diversidade cultivável de Actinobacteria obtida a partir da esponja *Hymeniacidon perleве*. Representatividade dos 7 organismos atribuídos ao filo pelo SINA *online*, distribuídos em 2 classes (círculo interior), 4 ordens (círculo intermediário, em negrito) e 5 famílias (círculo externo).



4.2 CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS

Alguns aspectos fisiológicos e taxonômicos dos membros mais relevantes serão discutidos em detalhes nesta seção. Aqueles que não demonstraram características a partir das quais se pode discutir sobre a ecologia da esponja, potencial biotecnológico, ou mesmo a respeito de sua própria categoria, foram omitidos.

4.2.1 Proteobacteria

Compondo a diversidade de Alphaproteobacteria encontram-se dois organismos classificados como pertencentes à ordem Rhodobacterales, Família Rhodobacteraceae e Gênero *Pseudovibrio* (PD3 e PD4), demonstrando íntima relação com a espécie *Pseudovibrio denitrificans*. A espécie foi descrita pela primeira vez por Shieh, Lin e Jean (2004) a partir de amostras de água do mar em Taiwan, sendo caracterizada como anaeróbica facultativa, apresentando metabolismo de fermentação e capacidade de denitrificação. Outras espécies do gênero foram detectadas em tunicados e corais além de esponjas, e são descritas como metabolicamente versáteis, embora sua fisiologia seja ainda pouco entendida (BONDAREV *et al.*, 2013). Um estudo com a esponja *Rhopaloeides*

odorabile, coletada em diferentes localidades da Grande Barreira de Corais australiana, demonstrou que uma linhagem provavelmente pertencente a esta bactéria domina a comunidade cultivável associada ao porífero (WEBSTER; HILL, 2001). Neste estudo, o organismo (que na época ainda não tinha sido descrito) esteve ausente nas amostras de água do mar do entorno, sugerindo sua natureza simbiote, além de indicar uma relação funcional para a esponja, por não ser detectada em espécimes doentes. Um estudo de Enticknap e colaboradores (2006) evidenciou a ocorrência de transmissão vertical desta alphaproteobactéria através da larva de sete espécies de esponja analisadas, reforçando a hipótese de que se tratam de verdadeiros simbioss, embora a sua presença em amostras de água do mar no estudo de Shieh e colaboradores tenha indicado o contrário. A mesma espécie foi mais tarde isolada de um tunicado (SERTAN-DE GUZMAN *et al.*, 2007), a partir da qual foi detectado e extraído um pigmento caracterizado como uma prodigiosina, apresentando, entre outras propriedades, atividade anti-*Staphylococcus aureus*. Como as análises que demonstraram a associação do organismo com esponjas basearam-se apenas na sequência de rRNA 16S para inferência taxonômica, é possível que aqueles indivíduos isolados de poríferos (incluindo os encontrados neste estudo) apresentem diferenças substanciais no restante do genoma e possam representar uma linhagem à parte de *P. detrificans*, exclusivamente associada ao Filo, ou ainda uma espécie diferente.

A presença de dois organismos (ASW10.2 e MA2) atribuídos ao clado marinho SAR11 de Alphaproteobactéria, classificados como *Candidatus Pelagibacter*, é um tópico importante. Embora estejam distribuídos de forma cosmopolita nos oceanos, dominando as comunidades de bacterioplâncton (MORRIS *et al.*, 2002) e podendo compreender cerca de 25% de todas as células bacterianas nestes ambientes (GIOVANNONI *et al.*, 2005), nenhum representante deste agrupamento havia sido descrito até o isolamento da cepa *Pelagibacter ubique* (RAPPÉ *et al.*, 2002), dando nome a uma nova ordem denominada Pelagibacterales, na qual *Pelagibacter* é o único gênero representante. Como até a presente data a *P. ubique* permanece como único integrante devidamente descrito deste clado, a nomenclatura adotada para organismos identificados a partir de sequências intimamente relacionadas a ela leva o radical indicativo de status taxonômico “Candidatus”. A *P. ubique* teve grande importância para a caracterização da rodopsina bacteriana, um pigmento do aparato fotossintético que funciona como uma bomba de prótons foto-induzida, a qual acredita-se ter um papel chave no balanço energético dos oceanos (GIOVANNONI *et al.*, 2005). A rodopsina só havia sido encontrada em arqueobactérias halófilas extremas, até uma sequência codificante ser detectada no genoma de membros do grupo SAR86 de gammaproteobactéria (BÉJÀ *et al.*, 2000). A função do gene nestes organismos permaneceu obscura (dada a inviabilidade de caracterização da via fotossintética por falta de representantes cultivados) até 2005, quando Giovannoni e colaboradores descobriram a proteína expressa na *P. ubique* e puderam finalmente descrevê-la no artigo já citado. Uma caracterização bioquímica dos organismos ASW10.2 e MA2 é importante para determinar se se tratam, de fato, de uma linhagem de *Pelagibacter ubique*, ou se

podem representar novos membros cultivados deste grupo extraordinariamente diverso e tão pouco explorado.

Dentro da classe Betaproteobacteria, os organismos ASW1 e MA3 (atribuídos à família Hydrogenophilaceae e ao clado marinho OM43, respectivamente) apresentam importantes características metabólicas a serem exploradas do ponto de vista simbiótico. Ambas são bactérias quimiolitotróficas, ou seja, obtêm energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos (sendo, portanto, aeróbicas obrigatórias). Apesar de não atingir o grau de similaridade mínimo para ser atribuída ao gênero com confiabilidade, a amostra ASW1 demonstrou relação com *Thiobacillus*, conhecidos por promover oxidação de ferro e enxofre para obtenção de nutrientes, enquanto os membros do clado OM43 são bactérias metilotróficas obrigatórias. Ao lado da SAR11, este clado compõe uma das linhagens mais abundantes de bacterioplâncton costeiros, e seu primeiro membro isolado demonstrou utilizar-se de metanol e formaldeído como fontes de energia, caracterizando-o como um especialista no metabolismo de compostos C1 (GIOVANNONI *et al.*, 2008). Embora nenhum das vias tenha sido caracterizada em associação com poríferos, a possível presença de *Thiobacillus* (ou outro gênero da família Hydrogenophilaceae) no tecido da esponja pode sugerir uma adaptação à presença de compostos que, em grande concentração, prejudicariam o balanço energético local, enquanto a presença de uma bactéria metilotrófica pode definir a participação da esponja em uma importante etapa da ciclagem de carbono no ambiente.

Outra presença de destaque entre os membros de Betaproteobacteria é o gênero *Burkholderia* (representado pela amostra PD10), composto por bactérias saprófitas comumente associadas a nódulos de leguminosas, onde promovem fixação de nitrogênio, por esse motivo sendo descritas como promissoras para aplicações biotecnológicas (WONG-VILLARREAL; CABALLERO-MELLADO, 2010). Podem, ser encontradas em diversos habitats, incluindo espécies patogênicas associadas a infecções hospitalares, e o ambiente marinho (sequências pertencentes ao gênero estão presentes na biblioteca de rRNA 16S da *Global Oceanic Survey*, um projeto do Instituto J. Craig Venter com o objetivo de quantificar a diversidade microbiológica nos oceanos). Sua característica como fixadora de nitrogênio pode ser um indicativo do papel das esponjas no ciclo deste nutriente.

Gammaproteobacteria demonstrou a maior diversidade entre as classes de Proteobacteria. Digna de nota é a presença do clado SAR86 da ordem Oceanospirillales, representada pelos organismos ASW10.1 e MA1. Sequências relacionadas a este agrupamento estão presentes com frequência e abundância entre as comunidades de bacterioplâncton da superfície dos oceanos em escala global, e características metabólicas importantes estão identificadas em seu genoma (DUPONT *et al.*, 2012). Como anteriormente mencionado, a existência de uma rodopsina bacteriana foi inicialmente descoberta em membros deste clado, e uma vez que esta proteína determina uma via fotossintética alternativa, sua caracterização pode significar avanços no entendimento do balanço energético em ambientes marinhos (BÉJÀ *et al.*, 2000). Membros deste clado permanecem

resistentes ao cultivo até a presente data, impossibilitando o aprofundamento do seu potencial metabólico. Mais uma vez faz-se necessário ressaltar a importância das culturas puras, significativamente obtidas neste trabalho, para estes estudos.

A Hahellacea *Endozoicomonas* (PD8), conhecida por compor a comunidade bacteriana associada a diversos invertebrados marinhos (NEAVE *et al.*, 2014) e o diverso gênero *Vibrio* (ASW3), frequentemente associado a esponjas e bastante estudado com relação a especificidade, biogeografia e funcionalidade nestes organismos (ALEX *et al.*, 2013) também estiveram presentes compondo a diversidade de Gammaproteobacteria. A presença de uma sequência indicada como *Pseudomonas aeruginosa* (SSW2) foi inicialmente encarada como proveniente de contaminação, uma vez que trata-se de uma espécie patogênica, mas existe o relato de uma cultura desta linhagem isolada a partir da esponja *Isodictya setifera* na Antártica, demonstrando a produção de metabólitos anti-bacterianos (JAYATILAKE *et al.*, 1996).

Provavelmente o organismo de maior potencial entre os isolados, a amostra PD2 diz respeito a um membro de Deltaproteobacteria pertencente ao gênero ainda não consolidado *Candidatus Entotheonella*. Os primeiros relatos da existência deste organismo vieram a partir de estudos com esponjas da ordem Lithistida, que vinham sendo investigadas por seu grande potencial de produção de metabólitos de interesse farmacológico, em especial peptídeos com atividade citotóxica/antitumoral (swinhólídeos) e antifúngica (theonegramidas e microescleroderminas) (BEWLEY; FAULKNER, 1994). Um estudo descrevendo a estrutura de duas microescleroderminas (BEWLEY; DEBITUS; FAULKNER, 1994) detectou que a localização celular dessas substâncias na esponja *Microscleroderma* sp. era a mesma de uma comunidade de bactérias filamentosas alojadas ao tecido, sugerindo que a sua produção poderia estar associada à presença destes microrganismos. Essas bactérias já haviam sido detectadas no estudo anterior de Bewley e Faulkner (1994) com a esponja *Theonella swinhoei*, e mais tarde foram indicadas como as verdadeiras produtoras dos compostos estudados (BEWLEY; HOLLAND; FAULKNER, 1996). A identidade destes microrganismos permaneceu desconhecida até a proposição do gênero candidato *Entotheonella* por Schmidt e colaboradores (2000) com base em análises filogenéticas a partir de sequências de rRNA 16S obtidas a partir da *T. swinhoei*. Apesar de inúmeras tentativas, nunca foi possível obter uma cultura pura destas bactérias, que foram detectadas em outros membros de Lithistida, sempre associadas a produção de substâncias naturais com um imenso repertório de atividades (antifúngica, antibacteriana, antiviral, antitumoral e citotóxica). O gênero parece ter uma grande diversidade, amplamente distribuída entre várias espécies de esponjas, e sequências codificantes para os diversos compostos de interesse já foram identificadas em seu genoma, com algumas tentativas de descrição das vias metabólicas associadas a sua produção, embora nunca claramente elucidadas pela falta de representantes cultivados. (WILSON *et al.*, 2014). A presença de uma sequência intimamente relacionada à *Entotheonella*, proveniente de uma cultura pura, como a obtida através do presente estudo, pode não só promover a validação do táxon, como também representar um imenso

avanço na caracterização dessas vias metabólicas e para a produção economicamente viável destas substâncias a partir de isolados.

4.2.2 Actinobacteria

Os organismos AIA1 e AIA3 foram atribuídos com confiabilidade ao gênero *Streptomyces*, mas apresentaram valores de similaridade muito próximos com diversas espécies, não sendo possível identificá-los a este nível. Além do fato anteriormente mencionado, a respeito de sequências de rRNA 16S não serem capazes de promover uma boa resolução a nível de espécie, *Streptomyces* frequentemente possuem mais de uma cópia deste gene, podendo apresentar variabilidade dentro do próprio indivíduo (KÄMPFER; GLAESER, 2012) o que dificulta em muito a diferenciação entre espécies sem outras sequências ou características fenotípicas para comparação. Seus integrantes compõe o maior gênero de Actinobacteria, e apesar de serem microrganismos típicos do solo, possuem grande versatilidade e apresentam um complexo metabolismo secundário, bastante explorado na produção de antibióticos de origem natural. Algumas espécies foram reportadas em associação com esponjas, inclusive à *Hymeniacidon perleve* (ZHANG *et al.*, 2006a).

A espécie *Actinoalloteichus hymeniacidonis* (representada pelo organismo AIA2) teve sua espécie tipo nomeada a partir da *Hymeniacidon perleve* (ZHANG *et al.*, 2006b), sendo tipicamente encontrada em associação com esta esponja. Até a presente data, não há relatos da presença deste microrganismo na coluna d'água, tampouco associado a outras espécies de poríferos e demais invertebrados marinhos, caracterizando uma linhagem não apenas esponja-específica, como também espécie-específica. Os mecanismos de transmissão do simbionte ainda não foram elucidados, e podem trazer importantes informações a respeito da coevolução de esponjas e microrganismos.

O organismo PD1 foi atribuído ao gênero *Rhodococcus*, demonstrando íntima relação com a espécie *Rhodococcus erythropolis*. Estas bactérias são conhecidas por seu grande potencial de biorremediação, atribuída a presença de vias catabólicas para diversos poluentes (LARKIN; KULAKOV; ALLEN, 2005). A *Hymeniacidon perleve* já foi investigada como biorremediadora demonstrando excelentes resultados (ZHANG *et al.*, 2010), embora o enfoque destes estudos tenha sido no potencial de filtração da esponja para a remoção de bactérias patogênicas contaminantes de sistemas de aquicultura. Aliado a sua possível associação com *Rhodococcus*, a *H. perleve* pode ser um forte candidato a modelo de biorremediação de largo espectro. Mais estudos são necessários para definir o tipo de associação destas bactérias com a esponja, além de investigar seu metabolismo de degradação de poluentes.

4.2.3 Outros filós

O clado marinho SAR202 (ao qual parecem pertencer as amostras PD7 e SSW5) é um grupo de bactérias mesopelágicas (embora também encontrem-se, em menor quantidade, na superfície) pertencentes ao filo Chloroflexi. Sua distribuição parece estar relacionada ao perfil vertical de nutrientes na coluna d'água, sendo mais abundantes em águas mais profundas, onde podem caracterizar até 40% da diversidade de bacterioplâncton (VARELA; VAN AKEN; HERNDL, 2008). Esta pronunciada representatividade sugere que devem desempenhar um papel importante na ciclagem de nutrientes nessas zonas, mas quase nada se sabe a respeito de sua atividade metabólica uma vez que não há indivíduos cultivados (MORRIS *et al.*, 2004). As sequências de PD7 e SSW5 demonstraram maior similaridade com indivíduos provenientes de esponjas (HENTSCHER *et al.*, 2002; KAMKE; TAYLOR; SCHMITT, 2010), mas não há dados suficientes para sugerir a possível existência de um subgrupo esponja-específico. Morris *et al.* (2004) apresenta uma tentativa de reconstrução filogenética a partir das sequências disponíveis relacionadas ao clado, e constatou que os subgrupos formados a partir desta análise não apresentam relações monofiléticas bem sustentadas. Neste estudo, as sequências provenientes de esponjas distribuíram-se em diferentes subgrupos ao lado de amostras de origem variada.

A amostra PD6 demonstrou pertencer ao clado PAUC34f atribuído ao filo Deferribacter. Todos os organismos deste filo descritos até hoje pertencem a uma única família (Deferribacteraceae), e possuem grande versatilidade de metabolismo anaeróbico, utilizando uma variedade de compostos que incluem enxofre, ferro, manganês e nitrato. A posição taxonômica do clado PAUC34f é incerta e por enquanto nada foi proposto a respeito de sua classificação, mas este estudo constatou que as sequências relacionadas a ele são majoritariamente provenientes de várias espécies de esponjas. Ainda não há estudos investigando características metabólicas, biogeográficas, funcionais ou relações de especificidade nestes organismos, mas sua proximidade com Deferribacter o torna bastante interessante de ser estudado do ponto de vista simbiótico. A carência de estudos relacionados aos seus integrantes e a sua aparente relação com o filo Porifera, aliado à obtenção de uma cultura pura destes organismos, caracterizam um tópico bastante prolífico ainda a ser estudado.

Outro organismo de destaque é o SSW6, relacionado ao gênero candidato Brocadia. Ao lado de outros quatro gêneros candidatos, compõe um grupo monofilético que reúne as bactérias que mediam os processos de oxidação anaeróbica de amônia (bactérias *anammox*, do inglês *anaerobic ammonium oxidation*), uma importante etapa do ciclo do nitrogênio (OSHIKI *et al.*, 2011). A presença de uma bactéria *anammox* associada à *H. perleve* reforça mais uma vez o possível papel das esponjas no ciclo do nitrogênio.

4.3 FILOGENIA

A filogenia descreve as relações evolutivas entre grupos de organismos, e para a taxonomia microbiana, tem sido utilizada como auxiliar na resolução da posição taxonômica de entidades de classificação incerta. Diversos métodos para a construção de árvores podem ser aplicados, dependendo do objetivo da análise que se pretende realizar. Neste estudo, o interesse foi investigar a proximidade dos organismos obtidos com os dois grupos já mencionados (isolados e originários de esponjas), de modo que o método de *Neighbor-Joining* foi escolhido para este fim. O *Neighbor-Joining* é um dos métodos que se baseia no princípio de evolução mínima, onde o percentual de diferenças entre sequências (a distância genética) é o critério utilizado para inferir as distâncias entre os organismos, representadas pelo comprimento dos ramos em um filograma. É, portanto, um método não-paramétrico, ou seja, assume que todas as substituições de nucleotídeos observadas entre uma sequência e outra possuem um mesmo significado, sem levar em conta um modelo evolutivo, que assuma diferentes pesos para cada uma dessas substituições. Assim sendo, não fornecem informações sobre o tempo de separação dos grupos comparados (para análises deste tipo, os métodos baseados em máxima verossimilhança e inferência bayesiana são utilizados) (TILLIER; COLLINS, 1995). Para ambas as árvores demonstradas a seguir, a arqueia *Methanocaldococcus jannaschii* foi utilizada como *outgroup*.

4.3.1 A problemática da seleção de sequências

A seleção de sequências para análise das relações entre os organismos obtidos e grupos conhecidos demonstrou-se uma tarefa bastante difícil, devido a dois fatores principais: 1) a limitação dos campos de busca disponíveis nos bancos de dados públicos; 2) a falta de critério no ato da deposição de sequências.

As plataformas de busca por sequências similares do Silva (SINA) e do RDP (SeqMatch) são as mais adequadas para seleção de sequências de rRNA 16S, uma vez que trabalham com bases de dados exclusivas de RNA ribossômico, que passam por uma curadoria mais criteriosa, além de levarem em consideração parâmetros referentes à estrutura molecular do gene, além da simples ordenação dos nucleotídeos, para retornar os resultados. Porém, nenhum dos portais dispõe de um mecanismo de busca que limite os resultados de acordo com a origem da sequência (por exemplo, apenas sequências provenientes de esponjas). O GenBank, por sua vez, trabalha com excelentes algoritmos de busca, mas que apresentam dificuldades relacionadas à base de dados sobre a qual operam. Existe uma biblioteca específica de rRNA 16S integrada à base de dados do GenBank, porém, uma parcela gigantesca de entradas para este gene encontram-se depositadas na biblioteca geral de nucleotídeos, de modo que limitações de busca aplicadas à biblioteca de rRNA 16S produzem resultados muito desfalcados.

Tendo em vista essas problemáticas, as três bases de dados foram utilizadas para selecionar diferentes conjuntos de sequências para análise, de

acordo com a melhor aplicabilidade de cada uma. Devido a confiabilidade dos parâmetros de alinhamento e a qualidade das sequências depositadas no banco de dados, o SINA *online* foi empregado na inferência taxonômica relatada na seção anterior, já que, para tal, não se faz necessário o conhecimento da origem das sequências utilizadas para comparação. Essas informações, no entanto, são necessárias para os casos em que se deseja comparar os resultados obtidos com, por exemplo, indivíduos isolados, como é o caso deste trabalho. Quando grande parte das sequências semelhantes provém de amostras ambientais e não há dados sobre a morfologia e a fisiologia do microrganismo, necessárias para o processo de validação de um táxon, é importante verificar que espécies já isoladas e descritas demonstram relação com as sequências-alvo, de modo a investigar a possibilidade de ocorrência de uma nova espécie. Como não é possível limitar a busca desta maneira no SINA, o SeqMatch do RDP foi utilizado para este fim. Também houve o interesse de comparar as sequências-alvo apenas com organismos provenientes de esponjas, sondando a existência de linhagens esponja-específicas, espécie-específicas, ou ainda algum padrão biogeográfico. A única plataforma que permite uma filtragem nesse sentido é o GenBank, de modo que, mesmo com a limitação da biblioteca de rRNA 16S, ele foi aplicado para a seleção destas ocorrências.

4.3.2 Relações com outros organismos isolados

Os resultados da análise filogenética (Figura 4) em comparação com outros organismos cultivados (Tabela 2) apresentaram diversas inconsistências no posicionamento esperado de seus integrantes. No entanto, vários desses posicionamentos, mesmo que inconsistentes, são amparados por uma explicação bastante lógica.

A busca por sequências similares provenientes de isolados, realizada contra a base de dados do RDP, retornou resultados com baixa porcentagem de similaridade para muitos organismos. Isso deve-se ao fato de que várias das amostras analisadas pertencem a táxons que não possuem representantes cultivados. Deste modo, muitos grupos que se sabe estarem presentes compondo a diversidade obtida estiveram mal representados no conjunto de sequências utilizado para a elaboração da árvore. Essa falta de integrantes mais representativos para comparação fez com que algumas amostras se reunissem em ramos que posicionam-se em desacordo com a filogenia conhecida. Observou-se que os ramos referentes às categorias hierárquicas mais específicas (ordens e famílias) apresentaram valores mais altos de *bootstrap*⁵, enquanto as ramificações mais abrangentes (filos, classes) não estão tão bem sustentadas, dando origem a agrupamentos menos consistentes – uma tendência geral na construção de árvores

⁵ O *bootstrap* é um dos métodos utilizados para estimar a confiabilidade dos ramos formados (FALSENSTEIN, 1985). Baseia-se na reamostragem de dados e seu valor, para este trabalho, representa o número de vezes em que um determinado ramo se formou para cada 100 árvores construídas.

Figura 4. Filograma (*Neighbor-Joining*) de microrganismos cultiváveis associados a esponja *Hymeniacidon perleve* (*), com resultados de maior similaridade encontrados entre sequências de isolados depositadas na base de dados do RDP. O código representado antes do nome da espécie refere-se ao número de acesso da sequência no GenBank. Em destaque encontram-se os filões de maior representatividade entre as amostras analisadas, com a coloração dos ramos indicando as classes. Os ramos não destacados representam os demais filões e/ou os agrupamentos que não apresentaram posicionamentos claros, condizentes com a literatura. A numeração na base de cada nó é referente aos valores de *bootstrap*, e a barra de escala representa um valor de referência para a distância genética entre os organismos (comprimento dos ramos), de acordo com o número de substituições de nucleotídeos homólogos na sequência analisada.

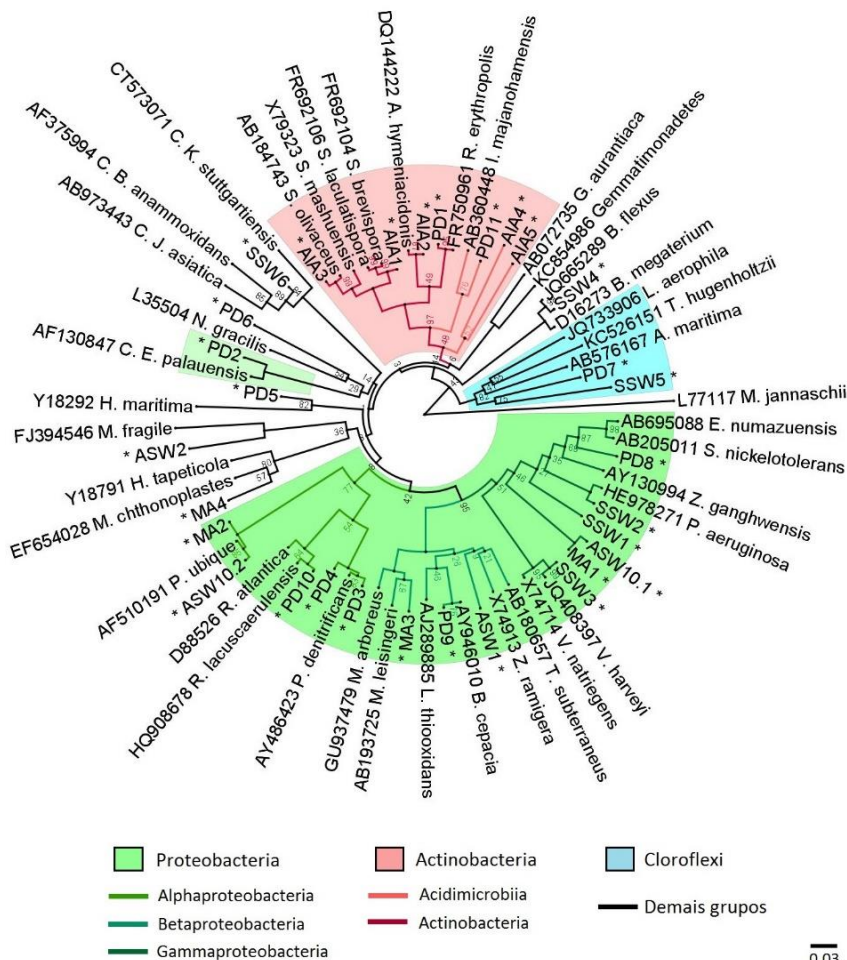


Tabela 2 – Identificação taxonômica dos organismos isolados utilizados para construção da árvore filogenética da Figura 4.

| Filo | Classe | Ordem | Família | Organismo | Número de Acesso |
|------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---|------------------|
| Actinobacteria | Acidimicrobia | Acidimicrobiales | Iamaceae | <i>Iamia maganohamensis</i> | AB360448 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Corynebacteriales | Nocardiaceae | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | FR750961 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Pseudonocardiiales | Pseudonocardiaceae | <i>Actinooideichnus hymeniacidionis</i> | DD144222 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces brevispora</i> | FR692104 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces laculatispora</i> | FR692106 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces musliensis</i> | X79323 |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces olivaceus</i> | AB184743 |
| Bacteroidetes | Bacteroidia | Bacteroidales | Marinellaceae | <i>Marinifilum fragile</i> | FJ394546 |
| Chloroflexi | Thermoflexia | Thermoflexales | Thermoflexaceae | <i>Thermoflexus hugenholtzi</i> | KC561551 |
| Chloroflexi | Caldilineae | Caldilineales | Caldilineaceae | <i>Litorilinea aerophila</i> | IQ733906 |
| Cyanobacteria | Adentitateriales | Adentitaterinales | Adentitaterinaceae | <i>Adentitaterina montana</i> | AB576167 |
| Cyanobacteria | Oscillatoria | Oscillatoriales | Holospirulina | <i>Holospirulina tapetula</i> | Y18791 |
| Euryarchaeota | Oscillatoria | Oscillatoriales | Coleofasciculus | <i>Coleofasciculus (Mycrocoleus) orthomphlostes</i> | EF654028 |
| Firmicutes | Methanococci | Methanococcales | Methanocaldococcaceae | <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (Archaea Outgroup) | U771117 |
| Firmicutes | Bacilli | Bacillales | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | D16273 |
| Gemmatimonadetes | Bacilli | Bacillales | Bacillaceae | <i>Bacillus flexus</i> | IQ665289 |
| Gemmatimonadetes | Gemmatimonadales | Gemmatimonadales | Gemmatimonadaceae | <i>Gemmatimonas aurantiaca</i> | AB072735 |
| Nitrospinae | Nitrospina | Nitrospinales | Nitrospinaeae | <i>Nitrospina gradlis</i> | L35504 |
| Planctomycetes | Planctomycetia | Candidatus Brocadiales | Candidatus Brocadaceae | <i>Kueenia stuttgartiensis</i> | CT573071 |
| Planctomycetes | Planctomycetia | Candidatus Brocadiales | Candidatus Brocadaceae | <i>Brocadia ornaminxodans</i> | AF375994 |
| Proteobacteria | Delephyroteobacteria | - | - | <i>Jettenia asiatica</i> | AB973443 |
| Proteobacteria | Delephyroteobacteria | - | - | <i>Entothionella palauensis</i> | AF130847 |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Desulfurellales | Desulfurellaceae | <i>Hiipaea maritima</i> | Y18292 |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Pelagibacterales | Pelagibacteraceae | <i>Pelagibacter ubique</i> | AF510191 |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales | Rhodobacteraceae | <i>Ruegeria atlantica</i> | D88356 |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales | Rhodobacteraceae | <i>Ruegeria lacuscaeruleus</i> | HQ908678 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Rhodobacterales | Rhododactaraceae | <i>Pseudovibrio denitrificans</i> | AY486423 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Methylophilales | Methylophilaceae | <i>Methylobacillus obryensis</i> | GU937479 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Methylophilales | Methylophilaceae | <i>Methylophilus leisingeri</i> | AB193725 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Burkholderiaceae | <i>Umobacter thiooxidans</i> | AJ289855 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Burkholderiaceae | <i>Burkholderia cepacia</i> | AY946010 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Rhodocyclales | Rhodocyclaceae | <i>Zoogloeus ramigerus</i> | X74913 |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Vibrionales | <i>Thiobacter subterraneus</i> | AB180657 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Vibrionales | Vibrionaceae | <i>Vibrio natriegens</i> | IC408397 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Vibrionales | Vibrionaceae | <i>Vibrio Harveyi</i> | X74714 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | HE978271 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales | Hahneliaceae | <i>Zooshikella ganghwensis</i> | AY130994 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales | Hahneliaceae | <i>Endozoicomonas nuntiusensis</i> | AB650088 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | - | - | <i>Sporobacter nickelotrans</i> | AB205011 |

filogenéticas, uma vez que as mudanças nos ramos externos tendem a se acumular nos ramos anteriores.

Os organismos PD2, PD5, PD6, ASW2, SSW6 e MA4, por exemplo, foram agrupados com seus vizinhos mais próximos com *bootstraps* elevados, mas estes ramos ficaram dispostos dentro de um único grande conjunto que inclui todo o ramo referente ao filo Proteobacteria. O organismo PD5, identificado como integrante de Gemmatimonadetes pelo SINA, foi posicionado distante de outro representante do filo (*G. aurantiaca*). O que pode explicar esta incongruência é que a sequência referente à amostra PD5 era ligeiramente menor que as demais (provavelmente devido a problemas durante a amplificação), de modo que uma região considerável foi perdida e interpretada como deleção durante o alinhamento. O organismo SSW6 foi agrupado com outros integrantes da ordem Brocadiales, formando um ramo que reúne gêneros de bactérias *anammox* ainda não descritas, mas este posicionamento também não pode ser considerado com muito peso uma vez que a sequência relacionada ao SSW6 também apresentou o problema de tamanho reduzido.

Outro resultado interessante foi o posicionamento das sequências PD2 e PD6 frente aos resultados disponíveis na base de dados. O organismo PD2, atribuído à Deltaproteobacteria pelo SINA, ficou posicionado distante do ramo que agrupou as demais sequências referentes ao filo. Já o organismo PD6, que foi identificado como pertencente ao filo Deferribacteres, posicionou-se ao lado de *Nitrospina gracilis*, que na base de dados Silva encontra-se classificado em Deltaproteobacteria. A única sequência pertencente a esta classe presente no conjunto de dados analisado (*Hippea maritima*) não foi agrupada juntamente a estes organismos, mas posicionou-se num ramo próximo. Através de uma consulta bibliográfica foi possível constatar que, recentemente, a ordem Desulfobacterales de Deltaproteobacteria, à qual pertenciam os organismos Candidatus Entotheonella (PD2) e *Nitrospina gracilis*, passou por uma revisão taxonômica e dois novos filos foram propostos: Nitrospinae (na qual está contido o gênero *Nitrospina*) e Tectomicrobia (à qual pertenceria o gênero *Entotheonella*) (WILSON *et al.*, 2014). Esses novos filos, assim como toda a classe Deltaproteobacteria, apresentam-se próximos a Deferribacteres de acordo com filogenias recentes (LÜCKER *et al.*, 2013), de modo que é justificável que tenham sido agrupados conjuntamente com um organismo atribuído a este táxon (PD6), tendo em vista as poucas sequências que foram utilizadas nesta reconstrução. Mesmo apresentando inconsistências internas, o ramo foi notavelmente disposto separado de Proteobacteria, o que sustenta a proposição de que, de fato, teriam origens distintas. É importante ressaltar que a sequência referente à *C. E. palauensis* (AF130847) apresentada na árvore, apesar constar entre os organismos isolados na base de dados do RDP, diz respeito à uma cultura mista desta bactéria (WILSON *et al.*, 2014).

As ramificações referentes aos filos Chloroflexi, Actinobacteria e Proteobacteria, embora tenham apresentado algumas inconsistências internas, de forma geral dispuseram satisfatoriamente os organismos entre as categorias (sobretudo as classes de Proteobacteria, que podem ser claramente discernidas na

árvores, ainda que a hierarquia esteja em desacordo com a literatura). É provável que este melhor posicionamento, em maior sintonia com o que se conhece até então, tenha se dado porque mais sequências destes dois filos estiveram disponíveis para comparação, fornecendo mais informações para sustentar as ramificações propostas.

4.3.3 Relações com outros organismos provenientes de esponjas

Basicamente as mesmas problemáticas de hierarquia observadas para a classificação discutida acima estiveram presentes na árvore (Figura 5) construída a partir das sequências similares derivadas de esponjas (Tabela 3): os organismos que apresentaram poucos (ou nenhum) integrantes do seu táxon para comparação foram agrupados com menos critérios, dando origem a ramos que não necessariamente refletem a filogenia proposta na literatura. Assim como nem todos os táxons presentes possuem membros cultivados, também alguns dos organismos analisados não possuem associação com esponjas, de modo que o conjunto selecionado não reuniu resultados semelhantes. A problemática da pouca representatividade foi ainda mais acentuada nesta abordagem, pois como mencionado anteriormente, muitas espécies que notadamente demonstram associação com esponjas tiveram suas sequências depositadas na biblioteca geral de nucleotídeos do GenBank, em vez de na biblioteca consultada para elaboração do conjunto aplicado nesta análise. Alguns ramos se posicionaram com base apenas nas sequências originadas a partir deste estudo (por exemplo, os organismos MA4, SSW5 e PD7, agrupados unindo os filos Cyanobacteria e Chloroflexi em um único ramo, e os organismos PD5, PD6 e SSW6, agrupados apesar de pertencerem a diferentes filos segundo a taxonomia utilizada como referência – Silva). O isolado PD2 (*C. E. palauensis*) foi agrupado com uma Deltaproteobactéria (*Desulfoluna spongiiphila*) da família Desulfobacteraceae, à qual a *Entotheonella* pertencia antes da revisão taxonômica, mas o ramo foi posicionado distante das demais proteobactérias assim como na análise anterior. Os isolados PD3 e PD4, pertencentes ao gênero *Pseudovibrio*, demonstraram-se relacionados ao organismo *Pseudovibrio axinellae*, isolado a partir da esponja *Axinella dissimilis*, pertencente à mesma ordem da *H. perleve* (Halichondrida) e proveniente de uma localidade próxima da área de coleta deste estudo (a costa de Cork, na Irlanda). Quanto a taxonomia das esponjas de onde foram isolados os organismos utilizados para construção da árvore, seis deles vieram de esponjas da ordem Halichondrida, quatro da ordem Haplosclerida, dois da ordem Astrophorida e os demais, de ordens isoladas. Quanto à localização geográfica, cinco deles foram isolados em esponjas do Japão, e outros cinco de localidades próximas (Filipinas, China e Coreia do Sul), três do Mediterrâneo e duas do Mar do Caribe. No entanto, não foi possível observar uma correlação clara entre a taxonomia dos microrganismos, as espécies de esponja de onde foram isolados e os locais de coleta. A maneira mais adequada de investigar estes padrões requer uma análise direcionada para cada táxon em questão, envolvendo uma seleção mais criteriosa do maior número possível de sequências similares, incluindo

também sequências de outros táxons próximos. Infelizmente, o tempo e a abordagem propostos para o presente trabalho não condizem com a profundidade necessária para resolver estas questões, requerendo um tempo adicional que poderia vir na forma de uma especialização ou um curso de Mestrado.

Figura 5. Filograma (*Neighbor-Joining*) de microrganismos cultiváveis associados à esponja *Hymeniacidon perleve* (*), com resultados de maior similaridade encontrados entre sequências provenientes de esponjas, depositadas no GenBank. O código representado antes do nome da espécie refere-se ao número de acesso da sequência. A numeração na base de cada nó é referente aos valores de *bootstrap*, e a barra de escala representa um valor de referência para a distância genética entre os organismos (comprimento dos ramos), de acordo com o número de substituições de nucleotídeos homólogos na sequência analisada.

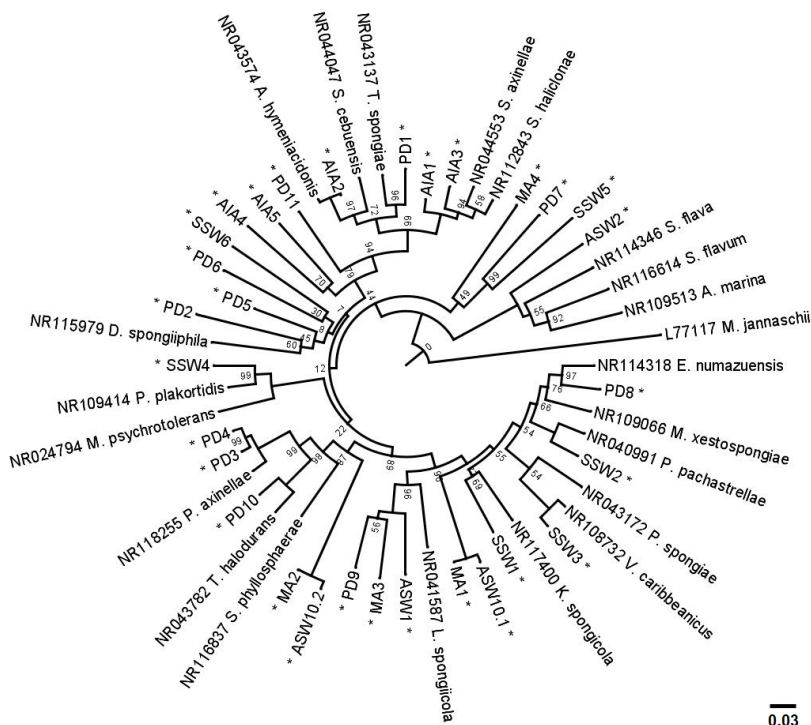


Tabela 3 – Identificação taxonômica dos organismos derivados de esponjas, utilizados para construção da árvore filogenética da Figura 5.

| Filo | Classe | Ordem | Família | Organismo | Número de Acesso | Esponja | Localidade |
|----------------|---------------------|-------------------|--------------------|--|------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Bacteroidetes | Flavobacteria | Flavobacteriales | Flavobacteriaceae | <i>Aureivirga marina</i> | NR_109513 | <i>Aixinea verrucosa</i> | Mediterrâneo (Israel) |
| Bacteroidetes | Flavobacteria | Flavobacteriales | Flavobacteriaceae | <i>Spongibacterium flammum</i> | NR_115614 | <i>Halichondria ostrogo</i> | Costa do Sul |
| Bacteroidetes | Flavobacteria | Flavobacteriales | Flavobacteriaceae | <i>Spongimonas flava</i> | NR_114346 | Não-identificada | Japão |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces halidoniae</i> | NR_112843 | <i>Halidonia</i> sp | Japão |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Streptomycetales | Streptomycetaceae | <i>Streptomyces axinellae</i> | NR_044553 | <i>Aixinea polyoides</i> | Mediterrâneo (França) |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Corynebacteriales | Tsukamuriceaceae | <i>Tsukamurella spongiae</i> | NR_043137 | Não-identificada | Mar do Norte |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Pseudonocardiales | Pseudonocardiaceae | <i>Saccharopolyspora cebuensis</i> | NR_044047 | <i>Halidonia</i> sp | Philippinas |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Pseudonocardiales | Pseudonocardiaceae | <i>Actinoalloteichus hymeniacidinis</i> | NR_043574 | <i>Hymeniacidon perleue</i> | Mar Amarelo (China) |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Desulfobacterales | Desulfobacteraceae | <i>Desulfajoua spongiophila</i> | NR_115979 | <i>Aplysina aerophoba</i> | Mediterrâneo |
| Firmicutes | Bacilli | Bacillales | Planococcaceae | <i>Planococcus plikartidis</i> | NR_109414 | <i>Plikartia simplex</i> | Baía de Bengala (Índia) |
| Firmicutes | Bacilli | Lactobacillales | Carnobacteriaceae | <i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i> | NR_024794 | Não-identificada | Japão |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales | Rhodobacteriaceae | <i>Pseudovibrio aximellae</i> | NR_118255 | <i>Aixinea dissimilis</i> | Cork (Irlanda) |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales | Rhodobacteriaceae | <i>Thalassosoccus halodurans</i> | NR_043782 | <i>Halichondria panicea</i> | Washington (EUA) |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Sphingomonadales | Sphingomonadaceae | <i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> | NR_116837 | <i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> | Golfo da Tailândia |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadales | Xanthomonadaceae | <i>Lysobacter spongiicola</i> | NR_041587 | <i>Pachastrella</i> sp | Japão |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Vibrionales | Vibrionaceae | <i>Vibrio carcharias</i> | NR_108732 | <i>Sceritodermis cyanea</i> | Mar do Caribe |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales | Pseudomonadaceae | <i>Pseudovibrio spongiae</i> | NR_043172 | <i>Mycale odiaerens</i> | Hong Kong |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas pachastrellae</i> | NR_040991 | <i>Pachastrella</i> sp | Philippinas |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales | Alteromonadaceae | <i>Mariobacter vestospongiae</i> | NR_109066 | <i>Xestospongia testudinaria</i> | Mar Vermelho (Egito) |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales | Halieaceae | <i>Endozoicomonas numazuensis</i> | NR_114318 | <i>Haplosetella</i> sp | Japão |

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho obteve sucesso em isolar microrganismos cultiváveis associados à *Hymeniacidon perleve*. Destes, muitos podem apresentar potencial biotecnológico (como já discutido na seção 4.2), entre eles as culturas PD3 e PD4 (produção de prodigiosinas anti-*Staphylococcus aureus* reportada na literatura), PD2 (indicação da produção de diversas substâncias antifúngicas, anticancerígenas, citotóxicas, entre outras), AIA1 e AIA2 (possível produção de antibacterianos), PD1 (relato da existência de vias de degradação para diversos poluentes) e SSW6 (presença de metabolismo *anammox*, utilizado para tratamento de águas residuais de processos industriais para remoção de contaminantes de amônia). Contudo, mais estudos necessitam ser conduzidos para confirmar a presença destas características e descrever estas atividades. Além disso, foi possível identificar organismos de grande interesse para outras áreas do conhecimento, como por exemplo, as amostras ASW10.1 e MA1, que podem ser os primeiros membros cultivados do clado marinho SAR86. A amostra PD2, além de possuir vias para a produção de diversos compostos de interesse, pertence a um gênero ainda não consolidado na literatura. A caracterização destes organismos pode representar a validação dos grupos aos quais pertencem e prover informações importantes sobre seu metabolismo e função, tópicos de interesse não somente para a taxonomia, mas também para a ecologia, fisiologia e biotecnologia.

No entanto, não foi possível obter informações conclusivas a respeito da especificidade dos microrganismos associados ao filo Porifera. De acordo com a literatura consultada, poucos organismos que apareceram entre as amostras parecem ser esponja-específicos. A maioria faz parte de grupos marinhos bastante generalistas, e apesar de alguns membros terem sido encontrados em associação com estes animais, não há informações suficientes para determinar se estes representam linhagens separadas daqueles encontrados em outros ambientes. Grande parte das dificuldades enfrentadas pelo presente estudo neste tópico estão relacionadas à limitação das ferramentas de busca disponíveis nos bancos de dados públicos, que falham ao dispor de uma metodologia que permita o levantamento direcionado de sequências provenientes de esponjas. Sabe-se que muitas destas sequências existem e estão disponíveis para consulta, de modo que é possível realizar um estudo muito mais aprofundado de cada um dos microrganismos obtidos e determinar aspectos que não foram abordados neste trabalho. Entretanto, uma busca muito mais criteriosa, não limitada à metodologia aqui adotada, é necessária.

A esponja *Hymeniacidon perleve* demonstrou ser um excelente objeto de estudo na caracterização de comunidades bacterianas associadas ao filo Porifera, tendo em vista a grande diversidade de grupos que foi possível obter a partir da metodologia apresentada neste trabalho. Os isolados obtidos apresentaram características que cobrem praticamente todos os aspectos de interesse no estudo das relações simbiote-hospedeiro nesses animais. Estudos mais aprofundados com cada um destes indivíduos, buscando caracterizar seu

metabolismo, suas relações filogenéticas com outros grupos, e as possíveis funções que podem exercer para a biologia da esponja, são tópicos que renderiam anos de pesquisa e importantes informações para o avanço do entendimento das relações entre microrganismos e o filo.

REFERÊNCIAS

- ACKERS, R. G.; MOSS, D.; PICTON, E. B.; STONE, S. M. K.; MORROW, C. C. **Sponges of the British Isles (“Sponge V”): A Colour Guide and Working Document**. 1992 Edition. Marine Conservation Society, 2007. 161 p.
- ALEX, A.; SILVA, V.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Evidence of unique and generalist microbes in distantly related sympatric intertidal marine sponges (Porifera: Demospongiae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- BECERRO, M. A. Quantitative trends in sponge ecology research. **Marine Ecology**, v. 29, n. 2, p. 167–177, 2008.
- BELL, J. J. The functional roles of marine sponges. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, n. 3, p. 341–353, 2008.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; CLARK, K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. Genbank. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D40–53, 2012.
- BEWLEY, C. A.; FAULKNER, D. J. Theonegramide, an Antifungal Glycopeptide from the Philippine Lithistid Sponge *Theonella swinhoei*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 4849–4852, 1994.
- BEWLEY, C. A.; FAULKNER, D. J. Lithistid Sponges: Star Performers or Hosts to the Stars. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 2162–2178, 1998.
- BEWLEY, C. A.; HOLLAND, N. D.; FAULKNER, D. J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. **Experientia**, v. 52, n. 7, p. 716–722, 1996.
- BEWLEY, C. A.; DEBITUS, C.; FAULKNER, D. J. Microsclerodermins A e B, antifungal cyclic peptides from the lithistid marine sponge *Microscleroderma* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 17, p. 7631–7636, 1994.
- BÉJÀ, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SUZUKI, M. T.; HADD, A. NGUYEN, L. P.; JOVANOVIĆ, S. B.; GATES, C. M.; FELDMAN, R. A.; SPUDICH, J. L.; SPUDICH, E. N.; DELONG, E. F. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1902–1907, 2000.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 1, p. 116–211, 2005.

BONDAREV, V.; RICHTER, M.; ROMANO, S.; PIEL, J.; SCHWEDT, A.; SCHULZ-VOGT, H. N. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2095–2113, 2013.

BORCHIELLINI, C.; MANUEL, M.; ALIVON, E.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; LE PARCO, Y. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 171–179, 2001.

BOUTE, N.; EXPOSITO, J. Y.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; NORO, N.; MIYAZAKI, K.; YOSHIKATO, K.; GARRONE, R. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. **Biology of the Cell**, v. 88 n. 1-2, p. 37-44, 1996.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, n. 41, p. D633-642, 2014.

DUPONT, C. L.; RUSCH, D. B.; YOOSEPH, S.; LOMBARDO, M.-J.; ALEXANDER RICHTER, R.; VALAS, R.; NOVOTNY, M.; YEE-GREENBAUM, J.; SELENGUT, J. D.; HAFT, D. H.; HALPERN, A. L.; LASKEN, R. S.; NEALSON, K.; FRIEDMAN, R.; CRAIG VENTER, J. Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. **The ISME Journal**, v. 6, n. 6, p. 1186–1199, 2012.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 19, p. 7843–7853, 1989.

ENTICKNAP, J. J.; KELLY, M.; PERAUD, O.; HILL, R. T. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3724–3732, 2006.

ERESKOVSKY, A. V.; GONOBABLEVA, E.; VISHNYAKOV, A. Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida). **Marine Biology**, v. 146, n. 5, p. 869–875, 2005.

FALSENSTEINS, J. Confidence limits in phylogeny: an approach using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FAN, L.; REYNOLDS, D.; LIU, M.; STARK, M.; KJELLEBERG, S.; WEBSTER, N. S.; THOMAS, T. PNAS Plus: Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. E1878–1887, 2012.

GAZAVE, E.; LAPÉBIE, P.; ERESKOVSKY, A. V.; VACELET, J.; RENARD, E.; CÁRDENAS, P.; BORCHIELLINI, C. No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. **Hydrobiologia**, v. 687, n. 1, p. 3–10, 2012.

GIOVANNONI, S. J.; BIBBS, L.; CHO, J.C.; STAPELS, M. D.; DESIDERIO, R.; VERGIN, K. L.; RAPPÉ, M. S.; LANEY, S.; WILHELM, L. J.; TRIPP, H. J.; MATHUR, E. J.; BAROFSKY, D. F. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. **Nature**, v. 438, n. 7064, p. 82–85, 2005.

GIOVANNONI, S. J.; HAYAKAWA, D. H.; TRIPP, H. J.; STINGL, U.; GIVAN, S. a.; CHO, J. C.; OH, H. M.; KITNER, J. B.; VERGIN, K. L.; RAPPÉ, M. S. The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1771–1782, 2008.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; ANJA, B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; BRADLEY, S.; FRIEDRICH, A. B.; MOORE, B. S. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4431–4440, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, a C.; GRIMWADE, J. E.; BAKER, B. J. Metabolites from an antartic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 3 p. 293–296, 1996.

KAMKE, J.; TAYLOR, M. W.; SCHMITT, S. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. **The ISME journal**, v. 4, n. 4, p. 498–508, 2010.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p.291-317, 2012.

LAPORT, M. S.; SANTOS, O. C. S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 86–105, 2009.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. a.; ALLEN, C. C. R. Biodegradation and *Rhodococcus* – Masters of catabolic versatility. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 282–290, 2005.

LEMOINE, N.; BUELL, N.; HILL, A.; HILL, M. Assessing the utility of sponge microbial symbiont communities as models to study global climate change: a case study with *Halichondria bowerbanki*. In: CUSTÓDIO, M. R.; LÔBO-HAJDU, G.; HAJDU, E.; MURICY, G. (Org.) **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, Museu Nacional, Rio de Janeiro. p. 419–425, 2007.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, a.; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JACOB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSKE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜSSBMAN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. H. ARB: A software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1363–1371, 2004.

LÜCKER, S.; NOWKA, B.; RATTEI, T.; SPIECK, E.; DAIMS, H. The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–19, 2013.

MEHBUB, M.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4539–4577, 2014.

MONTALVO, N. F.; HILL, R. T. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7207–7216, 2011.

MORARIU, V. I.; SRINIVASAN, B. V.; RAYKAR, V. C.; DURAIWAMI, R.; DAVIS, L. S. Automatic online tuning for fast Gaussian summation. *Advances in Neural Information Processing Systems* 21, p. 1113–1120, 2008.

MORRIS, R. M.; RAPPÉ, M. S.; CONNON, S. A.; VERGIN, K. L.; SIEBOLD, W. A.; CARLSON, C. A.; GIOVANNONI, S. J. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 806–810, 2002.

MORRIS, R. M.; RAPPÉ, M. S.; URBACH, E.; CONNON, S. A.; GIOVANNONI, S. J. Prevalence of the Chloroflexi-Related SAR202 Bacterioplankton Cluster throughout the Mesopelagic Zone and Deep Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2836–2842, 2004.

MURRAY, R. G.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 174–176, 1994.

NEAVE, M. J.; MITCHELL, C. T.; APPRILL, A.; VOOLSTRA, C. R. Whole-Genome Sequences of Three Symbiotic *Endozoicomonas* bacteria. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, p. 802–814, 2014.

OLSON, J. B.; THACKER, R. W.; GOCHFELD, D. J. Molecular community profiling reveals impacts of time, space, and disease status on the bacterial community associated with the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 1, p. 268–279, 2014.

ON, O. L.; PUI, Y. C.; YUE, H. W.; PAWLIK, J. R.; QIAN, P. Y. Evidence for vertical transmission of bacterial symbionts from adult to embryo in the Caribbean Sponge *Svenzea zeai*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6147–6156, 2009.

OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium “*Candidatus Brocadia sinica*”. **Microbiology**, v. 157, n. 6, p. 1706–1713, 2011.

PLoS Biology: **Ocean Metagenomics Collection** – J. Craig Venter Institute’s Global Ocean Sampling Expedition papers. Disponível em: <<http://www.ploscollections.org/article/browseIssue.action?issue=info:doi/10.1371/issue.pcol.v06.i02>>. Acesso em: 20 de junho de 2015.

PITA, L.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; ERWIN, P. M. Biogeography and Host Fidelity of Bacterial Communities in *Ircinia* spp. from the Bahamas. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 2, p. 437–447, 2013.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas: Current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 125–134, 2002.

PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, 1823-1829, 2012.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA database project: improved data processing and web based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590-596, 2013.

RAPPÉ, M. S.; CONNON, S. A.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 630-633, 2002.

RASTOGI, G.; SANI, R. K. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function and Dynamics in the Environment. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Org.) **Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications**, Springer-Verlag New York, p. 29-57, 2011.

ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.

SAPP, J. On the Origin of Symbiosis. In: SECKBACH, J.; GRUBE, M. **Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology**. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, v. 17. Springer Netherlands, p. 3-18, 2010.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533-542, 2009.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. a.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHMIDT, E. W.; OBRAZTSOVA, a. Y.; DAVIDSON, S. K.; FAULKNER, D. J.; HAYGOOD, M. G. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*". **Marine Biology**, v. 136, n. 6, p. 969-977, 2000.

SCHMITT, S.; TSAI, P.; BELL, J.; FROMONT, J.; ILAN, M.; LINDQUIST, N.; PEREZ, T.; RODRIGO, A.; SCHUPP, P. J.; VACELET, J.; WEBSTER, N.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M. W. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 564–576, 2012.

SERTAN-DE GUZMAN, A. A.; PREDICALA, R. Z.; BERNARDO, E. B.; NEILAN, B. A.; ELARDO, S. P.; MANGALINDAN, G. C.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; BARRAQUIO, W. L.; CONCEPCION, G. P. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 188–196, 2007.

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A. Anti-Cancer products from marine sponges: Progress and promise. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, 2015.

SHARP, K. H.; EAM, B.; JOHN FAULKNER, D.; HAYGOOD, M. G. Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 622–629, 2007.

SHIEH, W. Y.; LIN, Y. T.; JEAN, W. D. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2307–2312, 2004.

Solent Forum Publications. Solent Habitat Information Pack. Disponível em: <http://www.solentforum.org/publications/habitat_info_pack/>. Acesso em: 20 de junho de 2015.

SPERLING, E. A.; PETERSON, K. J.; PISANI, D. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 10, p. 2261–2274, 2009.

STIERLE, A. C.; CARDELLINA, J. H.; SINGLETON, F. L. A marine Micrococcus produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. **Experientia**, v. 44, n. 11-12, p. 1021, 1988.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 2, p. 295–347, 2007.

TILLIER, E.; COLLINS, R. Neighbor-Joining and Maximum Likelihood with RNA sequences: addressing the independence of sites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 7-15, 1995.

VAN SOEST, R. W. M.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; DE VOOGD, N. J.; SANTODOMINGO, N.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J. N. A. Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

VARELA, M. M.; VAN AKEN, H. M.; HERNDL, G. J. Abundance and activity of Chloroflexi-type SAR202 bacterioplankton in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1903–1911, 2008.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 545–51, 2006.

WEBSTER, N. S.; BLACKALL, L. L. What do we really know about sponge-microbial symbioses? **The ISME journal**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 2009.

WEBSTER, N. S.; HILL, R. T. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. **Marine Biology**, v. 138, n. 4, p. 843–851, 2001.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 335–346, 2012.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W.; BEHNAM, F.; LÜCKER, S.; RATTEI, T.; WHALAN, S.; HORN, M.; WAGNER, M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2070–2082, 2010.

WEBSTER, N. S.; WATTS, J. E.; HILL, R. T. Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. **Marine Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 600–608, 2001.

WILKINSON, C. R. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. **Marine Biology**, v. 49, n. 2, p. 169–176, 1978.

WILKINSON, C. R. Immunological Evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. **Royal Society of London**, v. 220, p. 509–517, 1984.

WILSON, M. C.; MORI, T.; RÜCKERT, C.; URIA, A. R.; HELF, M. J.; TAKADA, K.; GERNERT, C.; STEFFENS, U. a E.; HEYCKE, N.; SCHMITT, S.; RINKE, C.; HELFRICH, E. J. N.; BRACHMANN, A. O.; GURGUI, C.;

WAKIMOTO, T.; KRACHT, M.; CRÜSEMAN, M.; HENTSCHEL, U.; ABE, I.; MATSUNAGA, S.; KALINOWSKI, J.; TAKEYAMA, H.; PIEL, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, v. 506, n. 7486, p. 58–62, 2014.

WOESE, C.; FOX, G.; ZABLEN, L.; UCHIDA, T. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. **Nature**, v. 254, p. 83–86, 1975.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

YARZA, P.; RICHTER, M.; PEPLIES, J.; EUZEYBY, J.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F. O.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 241–250, 2008.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 635–645, 2014.

ZHANG, H.; LEE, Y. K.; ZHANG, W.; LEE, H. K. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: Isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 159–169, 2006a.

ZHANG, H.; ZHENG, W.; HUANG, J.; LUO, H.; JIN, Y.; ZHANG, W.; LIU, Z.; HUANG, Y. *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 2309–2312, 2006b.

ZHANG, X.; ZHANG, W.; XUE, L.; ZHANG, B.; JIN, M.; FU, W. Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 59–68, 2010.

APÊNDICE I

Formulação dos meios de cultura utilizados para o Isolamento de organismos cultiváveis associados à esponja *Hymeniacidon perleve*.

1. Ágar Água do Mar – (ASW)

Consiste em um meio simples contendo triptona como fonte de carbono, com sais mineirais e demais nutrientes provenientes apenas nas quantidades contidas na água do mar, de modo a simular da maneira mais próxima possível as condições em que se encontram no meio natural. Destina-se ao isolamento de organismos generalistas.

| | |
|--------------------------------|-------|
| Triptona | 5g |
| Extrato de levedura | 3g |
| Ágar | 15g |
| Água do mar esterilizada | 700mL |
| Água destilada | 300mL |

pH 8.5

Autoclavado a 121°C por 15 minutos.

2. Ágar Água do Mar 10% (ASW 10%)

Mesma composição do meio anterior, com concentração de nutrientes reduzida a 10% (Triptona – 0,5g e Extrato de levedura – 0,3g). Destina-se ao isolamento de organismos generalistas, mas com capacidade de crescimento a baixas concentrações de nutrientes.

3. Ágar Marinho (MA)

Meio mais comum utilizado para cultura de microrganismos marinhos, fornece os sais mineirais existentes na água do mar de modo artificial, em quantidades consideradas ideais, condições que dificilmente são encontradas em ambientes naturais, onde é comum que as águas se encontrem esgotadas de certas substâncias e/ou contenham outras em excesso. É destinado, também, a organismos generalistas, mas que encontrem alguma limitação de crescimento relacionada a quantidade de nutrientes, ou que sejam mais sensíveis a competição pelos mesmos.

| | |
|---------------------------|--------|
| Peptona | 5g |
| Extrato de levedura | 1g |
| Citrato férrico | 0,1g |
| Cloreto de sódio | 19,45g |
| Cloreto de magnésio | 8,8g |

| | |
|----------------------------|---------|
| Sulfato de sódio | 3,24g |
| Cloreto de cálcio | 1,8g |
| Cloreto de potássio | 0,55g |
| Bicarbonato de sódio | 0,16g |
| Brometo de potássio | 0,08g |
| Cloreto de estrôncio | 0,034g |
| Ácido bórico | 0,022g |
| Silicato de sódio | 0,004g |
| Fluoreto de sódio | 0,0024g |
| Nitrato de ammonia | 0,0016g |
| Fosfato de sódio | 0,008g |
| Água destilada | 1000mL |
| Ágar | 15g |

pH 7,6

Autoclavado a 121°C por 15 minutos.

4. Ágar Batata Dextrose (PD)

Trata-se de um meio de uso geral para o isolamento de fungos e leveduras, por conter substâncias que estimulam a esporulação e a produção de pigmentos. Dadas estas propriedades, também é utilizado como meio seletivo para Actinomycetes, que possuem essas características em comum com o reino Fungi. Este meio pode ser manufaturado a partir da infusão de batatas frescas, mas para este trabalho utilizar-se-á o meio disponível comercialmente, da marca Merck Millipore (preparado na concentração de 39g/L de água destilada, autoclavado a 121°C por 15 minutos).

5. Ágar Extrado de Levedura e Amido (Modificado) (SSW)

Meio amplamente utilizado para o isolamento de Actinomycetes que tenham preferência pela utilização do amido como fonte de carbono. Este meio será modificado para levar como metade de seu excipiente água do mar destilada, de modo a fornecer sais e demais nutrientes na concentração próxima à do ambiente natural.

| | |
|-----------------------------|-------|
| Extrato de levedura | 2g |
| Amido solúvel | 10g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | 500mL |
| Água do mar destilada | 500mL |

pH 7,2

Autoclavado a 121°C por 15 minutos.

6. Ágar Isolamento de Actinomycetes (AIA)

Meio disponível comercialmente (Himedia Labs) para o isolamento de Actinomycetes do solo e da água, preparado na concentração de 21,7g/L de água destilada, pH 8.1 e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

7. Extrato de esponja

Meio feito a partir de um mascerado do tecido da esponja, autoclavado e adicionado a uma mistura de 500mL de água destilada e 500mL de água do mar, sem adição de qualquer fonte de carbono ou demais nutrientes além daqueles existentes no próprio tecido da esponja e na água circunjacente. Tem como objetivo o isolamento de organismos capazes de crescer apenas a partir dos nutrientes disponíveis no hospedeiro, em condições de completa depleção.

